

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

FACULTATEA DE GEOGRAFIE ȘI GEOLOGIE

ȘCOALA DOCTORALĂ DE GEOȘTIINȚE

DOMENIUL ȘTIINȚA MEDIULUI

FACULTATEA DE BIOLOGIE

ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE

DOMENIUL BIOLOGIE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducători de doctorat:

Prof. univ. dr. habil. Nicoară Mircea Nicușor

CS. I dr. habil. Ciobîcă Alin Stelian

Student-doctorand:

CHELARU IONUȚ-ALEXANDRU

2026

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI



FACULTATEA DE GEOGRAFIE ȘI GEOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE GEOȘTIINȚE
DOMENIUL ȘTIINȚA MEDIULUI



FACULTATEA DE BIOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE
DOMENIUL BIOLOGIE

***Evaluarea efectelor toxicologice induse prin
administrarea de mixturi
(substanțe farmaceutice și micro-nanoplastice) la
specia model *Danio rerio****

Conducători de doctorat:

Prof. univ. dr. habil. Nicoară Mircea Nicușor

CS. I dr. habil. Ciobîcă Alin Stelian

Student-doctorand:

Chelaru Ionuț-Alexandru

MULȚUMIRI

Finalizarea acestei teze de doctorat reprezintă rezultatul unui parcurs academic și personal complex, desfășurat pe parcursul celor patru ani de pregătire doctorală, parcurs care nu ar fi fost posibil fără sprijinul, îndrumarea și susținerea unor persoane deosebite. Prin urmare, doresc să adresez câteva cuvinte de recunoștință tuturor celor care au contribuit, direct sau indirect, la realizarea acestei lucrări și la formarea mea ca cercetător și ca om.

În mod deosebit, adresez sincere mulțumiri coordonatorilor științifici ai tezei, domnilor prof. univ. dr. habil. Mircea Nicușor Nicoară și CS I dr. habil. Alin Stelian Ciobîcă, care, prin expertiza științifică, rigoarea academică și încrederea acordată, au avut un rol esențial în fundamentarea și dezvoltarea acestei teze de doctorat realizate în cotutelă. Îndrumarea constantă, sfaturile valoroase, libertatea oferită în explorarea ideilor de cercetare, precum și sprijinul moral acordat la nevoie au contribuit decisiv la finalizarea tezei.

Având în vedere caracterul interdisciplinar al acestei lucrări, doresc să îmi exprim recunoștința față de comisia de îndrumare, formată din Conf. univ. dr. Dorel Ureche, Șef lucr. dr. Gabriel-Ionuț Plavan, iar nu în ultimul rând, doamnei CS III dr. Roxana Strungaru-Jijie, pentru sprijinul științific acordat, sugestiile valoroase și îndrumarea oferită pe parcursul elaborării tezei. Contribuțiile acestora au fost importante în clarificarea direcțiilor de cercetare și în consolidarea fundamentului științific al lucrării.

În cadrul pregătirii doctorale am avut oportunitatea de a desfășura un stagiu de cercetare la Universitatea din Aveiro, Portugalia, unde am realizat o parte dintre experimentele incluse în această teză. Mulțumesc mentorilor mei din această perioadă, prof. dr. Isabel Lopes și dr. Cátia Venâncio, pentru suportul excepțional, îndrumarea de înaltă calitate și mediul profesional și uman deosebit, care au contribuit semnificativ atât la dezvoltarea mea științifică, cât și la cea personală.

Mulțumiri se îndreaptă, de asemenea, către colegii și prietenii mei, care m-au susținut, încurajat și sprijinit de-a lungul acestui parcurs. Fiecare discuție, sugestie sau gând bun oferit la momentul potrivit a avut un impact important asupra evoluției mele academice și personale.

În încheiere, doresc să adresez cele mai sincere mulțumiri familiei mele, pentru dragostea necondiționată, sprijinul moral și material, răbdarea și înțelegerea oferite pe tot parcursul acestor ani.

CUPRINS

LISTĂ DE ABREVIERI.....	6
CUVINTE CHEIE.....	8
INTRODUCERE.....	9
CAPITOLUL 1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU.....	13
<i>1.1. Contextul general</i>	<i>13</i>
<i>1.2. Substanțele farmaceutice</i>	<i>15</i>
<i>1.3. Micro-nanoplasticele</i>	<i>16</i>
CAPITOLUL 2. MATERIALE ȘI METODE.....	19
<i>2.1. Peștele zebură (Danio rerio) - modelul animal utilizat</i>	<i>19</i>
<i>2.2. Avizul etic.....</i>	<i>19</i>
<i>2.3. Expunerea la substanțe farmaceutice.....</i>	<i>20</i>
<i>2.3.1. Substanțele utilizate.....</i>	<i>20</i>
<i>2.3.2. Expunerea simplă și în amestec la ibuprofen și acid valproic.....</i>	<i>20</i>
<i>2.3.3. Expunerea simplă și în amestec la meropenem, ketoprofen și acid valproic</i>	<i>21</i>
<i>2.4. Expunerea la substanțe farmaceutice în amestec cu micro-nanoplastice</i>	<i>23</i>
<i>2.4.1. Substanțele și materialele utilizate.....</i>	<i>23</i>
<i>2.4.2. Expunerea simplă și în amestec la ketoprofen și micro-nanoplastice de polipropilenă</i>	<i>24</i>
<i>2.4.3. Expunerea simplă și în amestec la ketoprofen și micro-nanoplastice de acid polilactic.....</i>	<i>25</i>
<i>2.5. Testele efectuate.....</i>	<i>27</i>
<i>2.6. Evaluarea stresului oxidativ și activitatea acetilcolinesterazei.....</i>	<i>28</i>
<i>2.7. Analiza statistică a datelor</i>	<i>28</i>
CAPITOLUL 3. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	30

3.1. Studiul experimental nr. 1: Efectele individuale și combinate ale ibuprofenului și acidului valproic asupra dezvoltării și comportamentului peștilor zebră.....	30
3.1.1. Expunerea embrionilor (5 hpf) de <i>Danio rerio</i>	30
3.1.2. Expunerea larvelor (72 hpf) de <i>Danio rerio</i>	31
3.1.3. Expunerea adulților (8 luni) de <i>Danio rerio</i>	32
3.1.4. Discuții asupra studiului	33
3.2. Studiul experimental nr. 2: Efectele individuale și combinate ale meropenemului, acidului valproic și ketoprofenului asupra dezvoltării și comportamentului peștilor zebră	34
3.2.1. Expunerea embrionilor (5 hpf) de <i>Danio rerio</i>	35
3.2.2. Expunerea larvelor (72 hpf) de <i>Danio rerio</i>	36
3.2.3. Expunerea adulților (6 luni) de <i>Danio rerio</i>	38
3.2.4. Discuții asupra studiului	39
3.3. Studiul experimental nr. 3: Efectele individuale și combinate ale ketoprofenului și micro-nanoplasticelor de polipropilenă asupra dezvoltării și comportamentului peștilor zebră	40
3.3.1. Expunerea embrionilor (5 hpf) de <i>Danio rerio</i>	41
3.3.2. Expunerea larvelor (72 hpf) de <i>Danio rerio</i>	42
3.3.3. Expunerea adulților (8 luni) de <i>Danio rerio</i>	43
3.3.4. Discuții asupra studiului	44
3.4. Studiul experimental nr. 4: Efectele individuale și combinate ale ketoprofenului și micro-nanoplasticelor de acid polilactic asupra dezvoltării și comportamentului peștilor zebră.....	45
3.4.1. Expunerea embrionilor (5 hpf) de <i>Danio rerio</i>	45
3.4.2. Expunerea larvelor (72 hpf) de <i>Danio rerio</i>	47
3.4.3. Expunerea adulților (8 luni) de <i>Danio rerio</i>	48
3.4.4. Discuții asupra studiului	50
CONCLUZII.....	51
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	52

LISTĂ DE ABREVIERI

AChE = Acetilcolinesterază

AINS = Antiinflamatoare nesteroidiene

ALT = Transaminază glutamic piruvică

APX = Ascorbat peroxidază

ASD = Tulburare de spectru autist

AST = Transaminază glutamic oxaloacetică

ATCh = Acetiltiocolină

ATR = *Attenuated Total Reflectance (eng)* (Reflexie totală atenuată)

ATR-IR = *Attenuated Total Reflectance Infrared spectroscopy (eng)* (Spectroscopie în infraroșu cu reflexie totală atenuată)

BD = Timpul petrecut în brațul drept

BS = Timpul petrecut în brațul de start

BSt = Timpul petrecut în brațul stâng divizat

Cd = Cadmiu

COX = Ciclooxygenază

dpf = Zile post-fertilizare

DT = Distanța totală parcursă

EC = *Effective concentration (eng)* (Concentrația efectivă)

EC_{20, Mlf} = *Effective concentration inducing 20% malformations (eng)* (Concentrația efectivă care induce malformații la 20% din populație)

EC_{50, Mlf} = *Effective concentration inducing 50% malformations (eng)* (Concentrația efectivă care induce malformații la 50% din populație)

FDM = *Fused Deposition Modeling (eng)* (Modelare prin depunere fuzionată)

FET = *Fish Embryo Toxicity (eng)* (Toxicitate acută pe embrioni de pește)

FTIR = *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (eng)* Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier

GPx = Glutation peroxidază

GSH = Glutation

GST = Glutation S-transferază

hpf = Ore post-fertilizare

Ibu= Ibuprofen

Kp = Ketoprofen

LC = *Lethal concentration (eng)* (Concentrația letală)

LC₂₀ = *Lethal concentration 20% (eng)* (Concentrația letală care omoară 20% din populație)

LC₅₀ = *Lethal concentration 50% (eng)* (Concentrația letală care omoară 50% din populație)

LD = *Linear Dichroism (eng)* Dicroism liniar

LDH = Lactat dehidrogenază

LÎ = Limitele de încredere

MDA = Malondialdehidă

MIC = *Minimum inhibitory concentration (eng)* (Concentrația inhibitorie minimă)

MNPL = Micro-nanoplastice

Mp = Meropenem

MPL = Microplastice

n.d. = *Not detected (eng.)* (nu a fost detectat)

NPL = Nanoplastice

PA = Poliamidă

PBT = *Persistent, Bioaccumulative and Toxic substances (eng)* (Substanțe persistente, bioacumulative și toxice)

PE = Polietilenă

PET = Polietilen tereftalat

PLA= Acid polilactic

PP= Polipropilenă

PS = Polistiren

PVC = Policlorură de vinil

RA = Frecvența rotațiilor în sens antiorar

ROS = *Reactive Oxygen Species (eng)* (Specii reactive de oxigen)

ROUT = *Robust Regression and Outlier Removal (eng)* (Regresie robustă și eliminare a valorilor aberante)

RWWTP = *Raw Wastewater Treatment Plant (eng)* (Stație de epurare a apelor uzate brute)

SEM = Microscopie electronică de scanare/baleiaj

SOD = Superoxid dismutază

TD = Timpul petrecut în zona de decizie

TI = Timpul de imobilitate

TP = Timpul petrecut lângă pereți

TrS = Frecvența tranzițiilor către jumătatea superioară

TS = Timpul petrecut în jumătatea superioară

TSt = Timpul petrecut în brațul stâng

VÎ = Viteza medie de înot

VPA = Acid valproic

WWTPs = *Wastewater Treatment Plants (eng)* Stații de epurare a apelor uzate

CUVINTE CHEIE

Pește zebură, poluanți farmaceutici, micro-nanoplastice, acid polilactic, antiinflamatoare, antiepileptice, antibiotice.

Teza de doctorat cuprinde: 211 pagini – din care 8 pagini Introducere, 17 pagini Contextul actual al cunoașterii, 29 pagini Materiale și metode, 93 pagini Rezultate și discuții, 3 pagini Concluzii ; 73 Figuri ; 2 Tabele; 256 referințe bibliografice. În prezentul rezumat, cuprinsul, numerotarea figurilor și tabelor selectate și lista de abrevieri sunt păstrate sub aceeași formă ca în teza de doctorat. Bibliografia selectivă prezentată în rezumat include 46 din totalul celor 256 referințe bibliografice ale tezei de doctorat.

INTRODUCERE

Poluarea mediului acvatic reprezintă una dintre cele mai importante provocări ale prezentului, fiind determinată de intensificarea activităților antropice și de utilizarea pe scară largă a substanțelor chimice în diverse domenii. Printre poluanții emergenți, produsele farmaceutice și fragmentele de plastic de dimensiuni mai mici de 5 mm, precum microplasticele și nanoplasticele ocupă un loc principal datorită persistenței lor în ecosistemele acvatice și a efectelor complexe asupra organismelor vii.

Fie că este vorba de medicina umană sau veterinară, aproximativ 4000 de produse farmaceutice sunt fabricate și comercializate la nivel mondial, fiind utilizate pentru tratarea, prevenirea sau diagnosticarea bolilor (SanJuan-Reyes et al., 2017; Alkimin et al., 2020).

În urma unor studii de monitorizare s-a constatat faptul că substanțele farmaceutice nu pot fi degradate complet prin metodele convenționale folosite în stațiile de epurare a apelor uzate (WWTP), medicamentele și produșii lor de transformare ajungând, după utilizare, în mediile acvatice (Diniz et al., 2015; SanJuan-Reyes et al., 2017; Coimbra et al., 2021). Acest fapt a tras semnale de alarmă cu privire la dezvoltarea de noi tehnologii de eliminare a substanțelor farmaceutice care se regăsesc în concentrații de la ng L^{-1} la $\mu\text{g L}^{-1}$, atât în apele de suprafață, cât și în cele subterane, respectiv în apa potabilă (Muambo et al., 2024).

Poluanții farmaceutici, cum ar fi produșii antimicrobieni, antidiabetici, antidepresivele, anticonvulsivantele, analgezicele și medicamentele antiinflamatoare nesteroidiene (AINS), au atras atenția la nivel mondial datorită faptului că sunt larg răspândiți, se pot acumula în mediu și au efecte dăunătoare în special asupra ecosistemelor acvatice (Chelaru et al., 2025) și sănătății umane (Muambo et al., 2024; Szarka et al., 2024).

Conform cercetărilor anterioare, prezența simultană a mai multor compuși chimici în mediu poate genera o toxicitate diferită – fie amplificată, fie redusă – comparativ cu efectul unui singur agent (Gomes et al., 2024; Jijie et al., 2020; Wang et al., 2017; Yang et al., 2021). Coexpunerea la clorotalonil și procloraz a determinat o reducere a impactului asupra metabolismului embrionilor și larvelor de pește zebură (Yang et al., 2021). În plus, un studiu realizat de echipa noastră a confirmat efecte antagonice asupra comportamentului peștilor zebură

adulți și asupra stresului oxidativ, induse de expunerea pe termen scurt la un amestec de cadmiu, nichel și deltametrin (Jijie et al., 2020).

Mai mult decât atât, expunerea larvelor de pește zebură la amestecuri binare, ternare, cuaternare și quinquenare de pesticide timp de 96 h a evidențiat efecte sinergice (Wang et al., 2017). În mod similar, un alt studiu a constatat efecte comportamentale mai pronunțate la larvele de *Danio rerio* tratate simultan cu carbendazim și fipronil, comparativ cu cele expuse individual la pesticide (Gomes et al., 2024). Tratamentul concomitent cu cadmiu (Cd) și Kp, timp de 42 de zile, a indus modificări biochimice, comportamentale, cognitive și histopatologice la peștii zebură adulți (Madesh et al., 2024a), în timp ce expunerea parentală la Kp, în prezența Cd, a amplificat impactul asupra dezvoltării descendenților (F1), afectând funcția cardiacă și activitatea locomotorie (Madesh et al., 2024b). Efecte sinergice au fost raportate pentru amestecurile ternare formate din iprodion și piraclostrobin, asociate cu pirimetanil sau acetamiprid, în timp ce pentru amestecul cuaternar ce include iprodion, pirimetanil, piraclostrobin și acetamiprid s-a observat un efect antagonic (Wang et al., 2018).

În paralel, MNPL, rezultate din fragmentarea materialelor plastice, sunt omniprezente în mediu, datorită utilizării pe scară largă a polimerilor termoplastici precum acidul polilactic (PLA), PP și polietilena de densitate joasă (LDPE).

Acești polimeri sunt folosiți predominant în ambalaje alimentare, textile, produse de uz casnic și imprimare 3D, datorită proprietăților lor termice, de flexibilitate și rezistență mecanică, însă degradarea lor în ecosistemele acvatice generează particule micro- și nanometrice, cu potențial ecotoxicologic. Dimensiunile lor reduse și proprietățile fizico-chimice favorizează interacțiunea cu poluanți chimici, inclusiv medicamente, ceea ce poate amplifica efectele toxice și accelera procesele de bioacumulare. În plus, aceste interacțiuni pot conduce la degradarea mai rapidă a poluanților și la eliberarea substanțelor toxice în mediu. În acest context, investigarea impactului individual și combinat al acestor poluanți asupra organismelor model, precum *Danio rerio*, este esențială pentru înțelegerea riscurilor ecotoxicologice și pentru fundamentarea strategiilor de reducere a poluării. Cu toate acestea, există puține informații privind interacțiunile dintre substanțele farmaceutice și alți contaminanți emergenți, precum MNPL, care sunt din ce în ce mai frecvent întâlnite în ecosistemele acvatice.

Microplasticele (MPL) pot acționa ca vectori pentru poluanți, deoarece unii compuși farmaceutici se pot atașa pe suprafața lor prin fenomenul de adsorbție/desorbție iar pentru

organisme mai mari, precum peștii, acest lucru poate declanșa efectul de “Cal Troian”, fiind ingerate sau penetrând anumite membrane și putând provoca efecte și mai mari (Atugoda et al., 2021; Hildebrandt et al., 2021; Zhang și Xu, 2022). Deși interacțiunile dintre MNPL și unele substanțe farmaceutice (de ex., Ibu) au fost studiate (Barreto et al., 2023), nu există cercetări privind efectele combinate ale Kp și MNPL de PLA, de exemplu, în ciuda potențialelor efecte sinergice, antagonice sau cumulative.

Printre cele mai utilizate tipuri de plastic identificate în probele din mediu, sub formă de fibre și fragmente, se numără PP (Matjašič et al., 2023), datorită probabil calităților mecanice remarcabile ale acestui material (Hossain et al., 2024) și utilizării sale extinse în industria ambalajelor (Sid et al., 2021), în numeroase sectoare industriale. Proprietățile mecanice remarcabile ale acestui material, precum rezistența la temperaturi ridicate, toleranța chimică și durabilitatea (Yan et al., 2015; Maddah, 2016), fac PP adecvată, de asemenea, pentru fabricarea unor articole precum pâlnii, găleți, recipiente și alte instrumente (Nanthini Devi et al., 2021; Maddah, 2016). Pentru a acoperi golurile existente în literatura de specialitate, această teză de doctorat a urmărit evaluarea modului în care concentrațiile relevante ecologic de substanțe farmaceutice și MNPL influențează toxicitatea indusă.

În plus, cercetarea a inclus o abordare inovatoare prin testarea efectelor simple și combinate ale mai multor clase de contaminanți: substanțe farmaceutice (antiinflamatoare – Ibu și Kp; antiepileptice – VPA; antibiotice – Mp) și fibre/particule de MNPL provenite din PP și PLA. Au fost analizate amestecuri binare și ternare, inițial între substanțele farmaceutice, iar ulterior între MNPL și substanțele farmaceutice, realizând o comparație între plasticele convenționale și PLA. Experimentele au fost concepute utilizând concentrații relevante din mediu, aspect care conferă noutate studiului, și au fost aplicate la toate stadiile de dezvoltare a peștilor zebă (embrioni, larve și adulți), această specie fiind un model recunoscut în toxicologie.

Evaluarea efectelor toxicologice s-a realizat analizând rata de mortalitate, a malformațiilor, lungimea totală, distanța interoculară la larve, respectiv frecvența cardiacă și rata de eclozare la embrioni. În plus, după expunerea la tratamente individuale și combinate, s-a efectuat analiza comportamentală.

Testele efectuate pe adulții de *Danio rerio* s-au concentrat în principal pe comportamentul de explorare și pe preferința socială, urmărind parametrii cheie ai performanței la înot. Studiile efectuate în cadrul acestei teze de doctorat sunt importante, deoarece abordează

efectele expunerii simple la substanțe farmaceutice și impactul amestecurilor binare și ternare, reflectând scenarii realiste din mediile acvatice unde acești poluanți coexistă. Evaluarea interacțiunilor dintre compuși farmaceutici evidențiază riscuri ecotoxicologice complexe, care pot fi amplificate sau diminuate în funcție de natura amestecurilor. În plus, analiza expunerii concomitente la substanțe farmaceutice și MNPL este esențială, având în vedere prevalența tot mai mare a acestor contaminanți emergenți și potențialul lor de a modifica procese fiziologice critice, în stadiile timpurii de dezvoltare a organismelor acvatice.

Prin urmare, studiul contribuie la o înțelegere integrată a efectelor sinergice, antagonice sau cumulative, subliniind necesitatea extinderii cercetărilor asupra amestecurilor multiple și pe aceea a evaluării riscurilor pe întregul ciclu de viață a organismelor.

Pentru îndeplinirea scopului acestui studiu au fost formulate următoarele obiective specifice:

- **O1.** Determinarea efectelor toxice individuale și în amestecuri ale substanțelor farmaceutice selectate (Ibu, Kp, VPA, Mp) asupra diferitelor stadii de dezvoltare a peștelui zebra (embrioni, larve, adulți), utilizând concentrații relevante pentru mediu.
- **O2.** Evaluarea impactului MNPL de PP, respectiv PLA, individual, cât și în amestec cu contaminantul emergent Kp asupra diferitelor stadii de dezvoltare a peștelui zebra (embrioni, larve, adulți), utilizând concentrații relevante pentru mediu.
- **O3.** Corelarea parametrilor locomotori cu indicatorii comportamentului social, după expunerea adulților de *Danio rerio* la amestecuri farmaceutice, respectiv de substanțe farmaceutice cu MNPL.

Datorită caracterului ei interdisciplinar, această teză de doctorat a fost realizată în regim de cotutelă între Școala Doctorală de Geoștiințe și Școala Doctorală de Biologie din cadrul Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași. O parte dintre experimentele incluse în această lucrare au fost efectuate în cadrul Departamentului de Cercetare (CESAM) al Universității din Aveiro (Portugalia), pe durata unui stagiu Erasmus+, precum și în Departamentul de Biologie al Facultății de Științe din cadrul Universității „Vasile Alecsandri” din Bacău.

CAPITOLUL 1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

1.1. Contextul general

Produsele farmaceutice și derivații lor reprezintă în prezent o problemă de interes major, atât din perspectiva sănătății umane, cât și a protecției mediului (Ács et al., 2022; Moermond et al., 2022). Acești compuși sunt frecvent detectați în ecosistemele acvatice, dar efectele lor rămân în mare parte insuficient cunoscute, cu toate că cercetările recente indică o tendință de aprofundare a domeniului de studiu.

Situația se explică prin utilizarea excesivă a medicamentelor la nivel global, coroborată cu tratarea insuficientă sau inadecvată a apelor uzate (Ortúzar et al., 2022), întrucât numeroase stații de epurare nu dispun de tehnologia necesară pentru eliminarea completă a acestor reziduuri. Chiar și în concentrații foarte reduse, poluanții farmaceutici, adesea prezenți sub formă de nanoparticule dificil de detectat, pot genera efecte negative asupra populațiilor acvatice (Desai et al., 2022).

Deversarea apelor insuficient tratate în apele de suprafață, precum râuri și lacuri, determină expunerea ecosistemelor acvatice la ingrediente farmaceutice active, cu posibilitatea de a afecta negativ sănătatea mediului (Hong et al., 2021), dar și de a genera riscuri pentru sănătatea umană (Wilkinson et al., 2022). Există posibilitatea ca aceste ape să fie reintroduse în sistemul de alimentare cu apă potabilă, chiar dacă procesele de tratare nu elimină complet anumite substanțe farmaceutice active. Din acest motiv, cercetările recente se concentrează pe dezvoltarea și aplicarea unor metode eficiente de îndepărtare a acestor poluanți, incluzând abordări biologice și chimice, precum și tehnologii avansate, cum ar fi tratamentul cu radiații UV sau utilizarea cărbunelui activ (Onesios-Barry et al., 2014).

Printre ingredientele farmaceutice cel mai frecvent identificate în apele uzate se regăsesc substanțele antiepileptice, antidiabetice, antiinflamatoare și antibiotice. Numeroase studii au raportat prezența fenitoiniei (antiepileptic) în efluenții stațiilor de epurare, în apele provenite din unități spitalicești, în corpurile de apă de suprafață și chiar în apa potabilă (Cardoso-Vera et al., 2022). Soluțiile destinate reducerii contaminării apei cu poluanți farmaceutici trebuie să fie sustenabile. Acest lucru implică dezvoltarea și implementarea unei infrastructuri adecvate

pentru colectarea și tratarea apelor uzate, precum și adoptarea de către stațiile de epurare a unor tehnologii avansate capabile să elimine complet substanțele farmaceutice active.

O soluție imediată ar putea fi utilizarea responsabilă a medicamentelor, prin prescripții controlate și prin aplicarea unor restricții mai stricte privind dozarea. În acest sens, Moermond și colaboratorii (2022) au propus o abordare „verde”, orientată ecologic, care urmărește identificarea și respectarea unor criterii esențiale pentru protecția mediului. Această abordare vizează reducerea impactului reziduurilor farmaceutice asupra organismelor acvatice și a verigilor cheie din lanțurile trofice, diminuarea expunerii prin emisii scăzute sau prin (bio)degradabilitate în mediu, evitarea substanțelor PBT (persistente, bioacumulative și toxice) și atenuarea riscurilor ecotoxicologice. În acest context, Moermond et al. (2022) au elaborat o schemă grafică a ciclului propus, pe care am adaptat-o și completat-o pentru a facilita o înțelegere mai clară a fenomenului (Fig. I.1.).

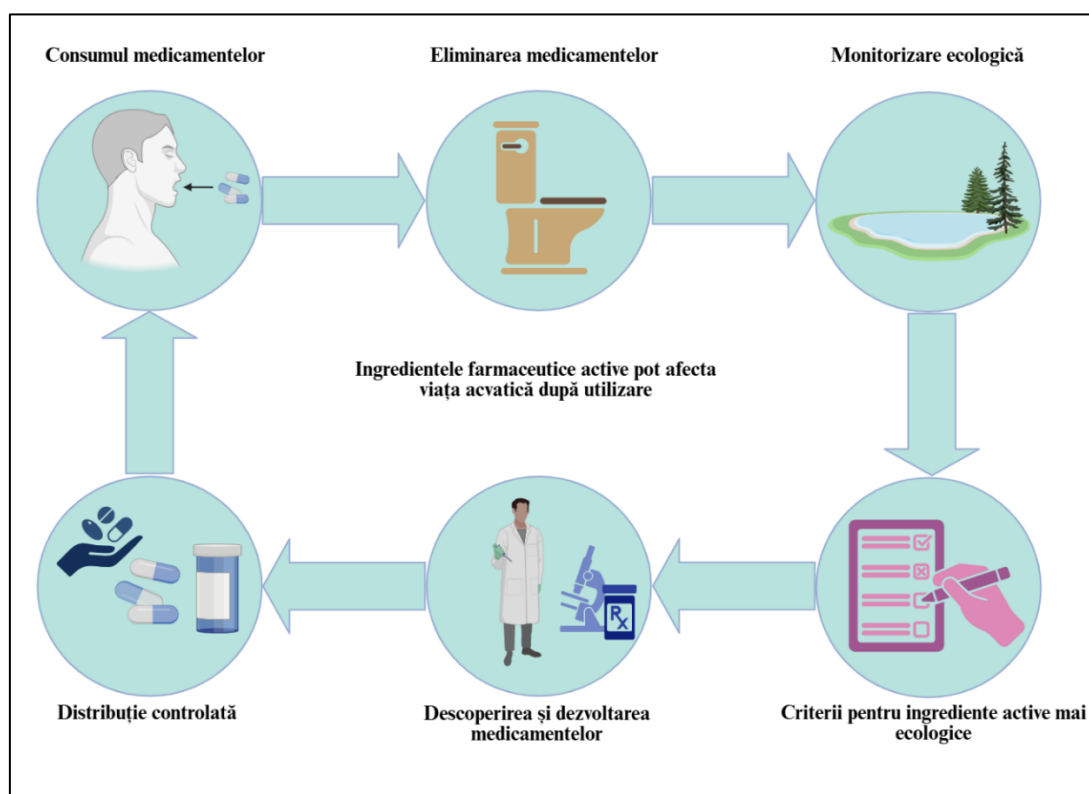


Fig. I.1. Ilustrație grafică a circuitului substanțelor farmaceutice în cazul aplicării unor criterii ecologice; Creată în BioRender (După Moermond et al., 2022).

1.2. Substanțele farmaceutice

Un compus farmaceutic activ este definit ca o substanță utilizată în procesul de dezvoltare a unui produs medicinal, care, prin integrarea în etapa de fabricație, devine ingredientul activ al acestuia. Acest compus este conceput pentru a exercita o acțiune farmacologică, imunologică sau metabolică, având ca scop restabilirea, corectarea sau modificarea funcțiilor fiziologice, ori pentru a contribui la stabilirea unui diagnostic medical.

În prezent, poluarea farmaceutică reprezintă o problemă majoră la nivel global (Wohler et al., 2020), determinată atât de prezența ingredientelor farmaceutice active, cât și a substanțelor inerte, precum materialele polimerice folosite pentru ambalare, care au atras un interes considerabil (Desai et al., 2022), datorită potențialului lor de a produce efecte negative asupra mediului și sănătății umane (Millarhouse et al., 2020; Wilkinson et al., 2022). Acești poluanți pot fi nocivi chiar și la concentrații foarte reduse (Desai et al., 2022). În consecință, cercetările recente s-au orientat către dezvoltarea și implementarea unor metode eficiente pentru eliminarea acestor reziduuri farmaceutice (Onesios-Barry et al., 2014).

Prezența acestor substanțe în mediu este determinată în principal de consumatori, prin utilizarea și eliminarea medicamentelor. Doar un procent redus din medicamentele administrate este metabolizat, în timp ce restul este excretat parțial prin transpirație, dar în proporție majoritară prin urină și materii fecale, ajungând astfel în apele uzate și, ulterior, în mediul înconjurător.

Așa cum au evidențiat Ortúzar et al. (2022), tehnologiile avansate de tratare biologică: nămolul activat convențional modificat, sistemele granulare aerobe, bioreactoarele cu pat mobil, bioreactoarele membranare și procesele Anammox - joacă un rol central în creșterea eficienței epurării apelor uzate (Ortúzar et al., 2022). Prezentarea lor schematică oferă un cadru util pentru înțelegerea modului în care operează aceste sisteme și a modului în care produșii secundari, precum nămolul rezidual, pot contribui la transferul medicamentelor în mediul înconjurător, așa cum este prezentat în (Figura I.2.).

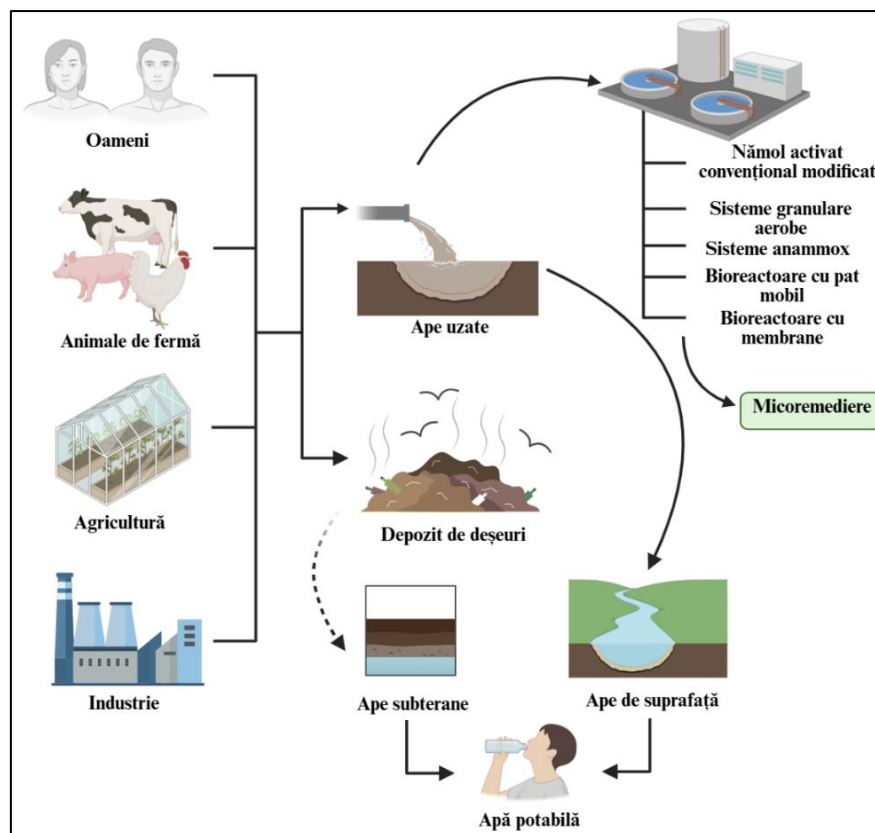


Fig. I.2. Principalele surse de poluanți farmaceutici din mediul înconjurător; Creată în BioRender (După Ortúzar et al., 2022; Chelaru et al., 2026b).

1.3. Micro-nanoplasticele

Micro-nanoplasticele (MNPL) sunt particule plastice ≤ 5 mm provenite din surse primare, precum microsferă sau fibre sintetice, și secundare, rezultate din degradarea deșeurilor plastice mai mari, cum ar fi: PET-uri sau pungi (Andrady, 2011; Song et al., 2024).

Creșterea rapidă a producției de materiale plastice și dependența continuă de combustibili fosili pentru fabricarea acestora au contribuit la numeroase probleme de mediu și efecte nocive asupra sănătății. În consecință, poluarea cu plastic a devenit o amenințare tot mai mare pentru ecosistemele naturale, sănătatea umană și climă (Karali et al., 2024). Așa cum este prezentat în Fig. I.3. MPL provin dintr-o varietate de surse primare și secundare, asociate activităților umane din diferite domenii.

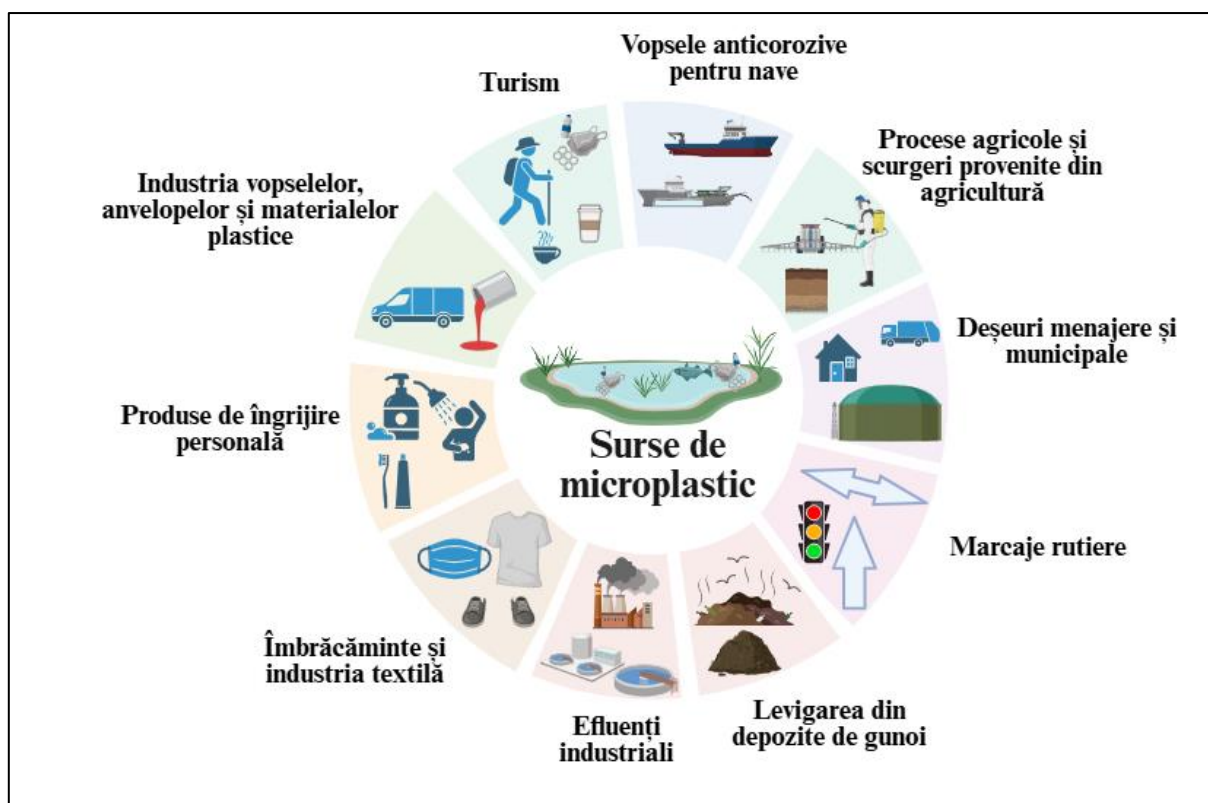


Fig. I.3. Principalele surse de microplastic din mediul înconjurător; Creată în BioRender (după Kataria et al., 2024).

MNPL acționează ca vectori de poluanți precum substanțe farmaceutice, metale grele și compuși organici persistenți, care, ingerate de organismele acvatice, ar putea provoca stres oxidativ, toxicitate celulară și disfuncții metabolice (Atugoda et al., 2021; Abdollahi et al., 2025; Klavins et al., 2022; Narwal et al., 2024; Savuca et al., 2024). MNPL prezintă o capacitate ridicată de sorbție pentru compuși organici persistenți, datorită suprafeței lor mari și caracteristicilor hidrofobe, iar procesul de desorbție în medii acvatice poate facilita transferul acestor contaminanți către organisme, amplificând riscurile ecotoxice. Pentru o înțelegere mai facilă a fenomenului, s-a realizat o ilustrare grafică a acestuia (Fig. I.6.).

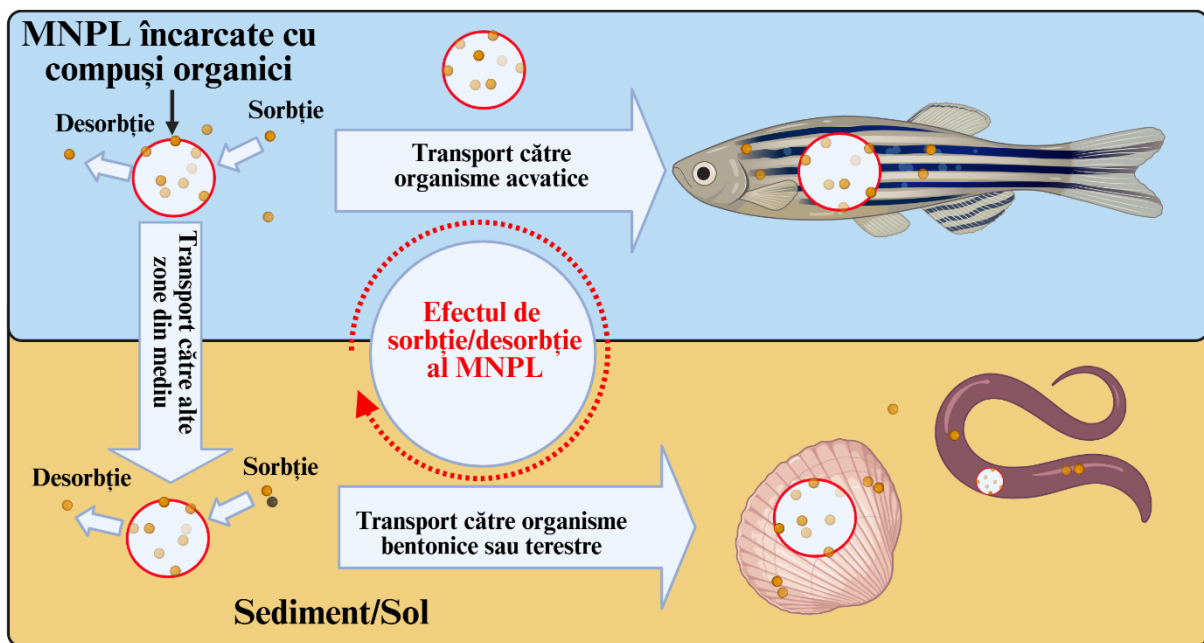


Fig. I.6. Fenomenul de “cal troian”, în mediul acvatic; Creată în BioRender (după Zhang și Xu, 2020).

Având în vedere complexitatea surselor, mecanismelor și efectelor MPL asupra mediului și sănătății umane, este necesară o abordare integrată, care să evidențieze aceste interacțiuni.

CAPITOLUL 2. MATERIALE ȘI METODE

2.1. Peștele zebră (*Danio rerio*) - modelul animal utilizat

În cadrul acestei cercetări a fost evaluată toxicitatea a patru compuși farmaceutici asupra peștilor zebră (*Danio rerio*) în diferite stadii de dezvoltare (embrioni, larve și adulți), prin evaluarea parametrilor de stres oxidativ, testelor comportamentale și activitatea AChE. Efectele Ibu, Kp, Mp și VPA au fost analizate individual, precum și în amestecuri binare și ternare, pe parcursul unei perioade de expunere de 96 ore. De asemenea o altă nișă ce a vizat și amestecurile dintre substanțele farmaceutice și MNPL de PP și PLA a fost abordată prin modelarea experimentală pe toate stadiile de dezvoltare a peștilor zebră.

Peștele zebră (*Danio rerio*) reprezintă un organism model sensibil și frecvent utilizat pentru evaluarea neurotoxicității compușilor periculoși, datorită costurilor reduse, fecundității ridicate, diversității răspunsurilor comportamentale și similitudinilor funcționale, moleculare și genetice cu oamenii (Zhang et al., 2024; Zhao et al., 2024).

Astfel, testele toxicologice includ atât embrioni, cât și larve, ceea ce ne oferă o imagine completă a modului în care organisme, în stadii evolutive incipiente, răspund la expunerea la diferiți factori externi (chimici, fizici etc.). Aceste stadii evolutive permit analiza directă a proceselor fundamentale de dezvoltare în condiții controlate, iar larvele arată cum substanțele interferează cu țesuturile deja funcționale și dacă acestea sunt mai sensibile decât embrionii în lipsa corionului. Cu ajutorul acestor două momente esențiale ale ontogenezei, interpretările experimentale sunt mai viguroase și există un cadru mai precis pentru a înțelege impactul posibil al contaminanților asupra speciilor acvatice.

2.2. Avizul etic

Toate procedurile de la acomodare, reproducere, și modelare experimentală la peștii zebră au respectat legislația română în vigoare și au fost aprobate de Comisia de Etică a Facultății de Biologie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, România (Nr. 343/09.02.2023; Nr. 1273/19.05.2023; Nr. 96/18.06.2024; Nr. 5526/03.12.2025).

2.3. Expunerea la substanțe farmaceutice

2.3.1. Substanțele utilizate

Soluția lichidă de Ibu ($400 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$), de Kp (50 mg mL^{-1}), comprimatele de VPA (500 mg), precum și flacoanele cu pulbere de Mp (500 mg) au fost obținute prin intermediul instituției, de la farmacii locale autorizate. Soluțiile stoc de Ibu (100 mg L^{-1}), Kp (100 mg L^{-1}), VPA (100 mg L^{-1}) și Mp (100 mg L^{-1}) au fost preparate *de novo* prin dizolvarea compușilor corespunzători în apă distilată. Peștii zebură adulți au fost utilizați pentru analiza stresului oxidativ și pentru determinarea activității AChE la speciile de *Danio rerio* expuse la compușii farmaceutici testați. După expunerea organismelor la substanțele farmaceutice, s-au utilizat reactivi achiziționați de la Merck, Darmstadt, Germania pentru determinarea proteinelor totale, analiza stresului oxidativ și activitatea AChE.

2.3.2. Expunerea simplă și în amestec la ibuprofen și acid valproic

➤ Expunerea embrionilor (5 hpf) de *Danio rerio*

Expunerea a început la vârsta de 5 hpf și s-a încheiat la 96 hpf, organismele fiind evaluate la intervale de 24 h, cu observarea punctelor cheie de dezvoltare la stereomicroscop. Pe toată durata experimentului, organismele au fost menținute în condiții controlate, la o temperatură de $28 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, cu un ciclu de lumină/întuneric de 14:10 h. Pentru a asigura stabilitatea condițiilor experimentale, mediul de cultură a fost schimbat la fiecare 24 h, pe toată durata expunerii. La 48 hpf a fost monitorizată frecvența cardiacă, iar la 96 hpf a fost analizat comportamentul în condiții de lumină și întuneric, urmat de fotografierea larvelor cu o cameră cu ocular DinoEye pentru efectuarea măsurătorilor biometrice, incluzând lungimea totală, distanța interoculară și diametrul lentilei oculare.

➤ Expunerea larvelor (72 hpf) de *Danio rerio*

Expunerea a început la vârsta de 72 hpf și s-a încheiat la 168 hpf, organismele fiind evaluate la intervale de 24 h, pentru observarea punctelor-cheie de dezvoltare la stereomicroscop. Pe toată durata experimentului, organismele au fost menținute în condiții controlate, la o temperatură de $28 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, cu un ciclu de lumină/întuneric de 14:10 h. Pentru a asigura stabilitatea condițiilor experimentale, mediul de cultură a fost schimbat la fiecare 24 h, pe toată durata expunerii. La finalul expunerii a fost analizat comportamentul larvelor în

condiții de lumină, respectiv de întuneric, urmat de fotografierea acestora cu o cameră cu ocular DinoEye pentru efectuarea măsurătorilor biometrice, incluzând lungimea totală, distanța interoculară și diametrul lentilei oculare.

➤ Expunerea adulților (8 luni) de *Danio rerio*

S-au utilizat exemplare adulte de pești zebra (*Danio rerio*), linia genetică AB, în vârstă de 8 luni, cu o masă corporală medie de $0,74 \pm 0,1$ g și o lungime standard medie de 40 ± 2 mm, obținute de la un crescător autorizat și certificat din Iași, România, în conformitate cu reglementările naționale privind bunăstarea animalelor. Peștii au fost inițial acomodați timp de 14 zile la condițiile de laborator, într-un acvariu de 92 L, după care au fost transferați în acvarii experimentale de 10 L și menținuți suplimentar timp de 3 zile pentru adaptare. Expunerea a avut o durată de 96 h, după care indivizii au fost evaluați individual, într-o ordine randomizată, în funcție de condiția de expunere.

Pe durata aclimatizării și a experimentului, peștii au fost menținuți în acvarii cu oxigenare continuă, apă declorinată reînnoită zilnic și parametri de calitate controlați constant (temperatură 26 ± 1 °C, pH 7,5, oxigen dizolvat $7,2 \pm 0,1$ mg L⁻¹, concentrație de amoniac < 0,004 ppm și conductivitate 500 μS), sub un ciclu de lumină/întuneric de 14:10 h și un regim alimentar standard, peștii fiind hrăniți de două ori pe zi cu hrană comercială uscată (fulgi TetraMin™), într-o cantitate echivalentă cu aproximativ 2% din masa corporală pe zi.

Pentru a asigura stabilitatea condițiilor experimentale, mediul a fost schimbat la fiecare 24 h, pe toată durata expunerii. Evaluările comportamentale au fost efectuate individual, într-o sală dedicată, în intervalul orar 09:00–17:00, utilizând testul acvariului nou și testul de preferință socială, conform protocoalelor de lucru descrise anterior (Jijie et al., 2020; Paduraru et al., 2024).

2.3.3. Expunerea simplă și în amestec la meropenem, ketoprofen și acid valproic

➤ Expunerea embrionilor (5 hpf) de *Danio rerio*

Expunerea a început la vârsta de 5 hpf și s-a încheiat la 96 hpf, fiecare condiție experimentală incluzând n = 10 organisme. Organismele au fost expuse individual, câte unul în fiecare godeu, în plăci de 24 de godeuri, iar mediul de expunere E3 a fost reînnoit zilnic. Pe întreaga durată a experimentului, organismele au fost menținute în condiții controlate, la o

temperatură de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, cu un ciclu de lumină/întuneric de 14:10 h, într-o cameră climatică Mikrotest. Pentru a asigura stabilitatea condițiilor experimentale, mediul de cultură a fost schimbat la fiecare 24 h, pe toată durata expunerii.

Evaluările au fost realizate la intervale de 24 h, cu monitorizarea la stereomicroscop a punctelor cheie de dezvoltare; la 48 hpf au fost urmărite bătăile cardiace, la 72 hpf a fost determinată rata de eclozare, iar la 96 hpf a fost analizat comportamentul larvelor în condiții de lumină, respectiv de întuneric, urmat de fotografierea acestora cu o cameră cu ocular DinoEye pentru efectuarea măsurătorilor biometrice, incluzând lungimea totală, distanța interoculară și diametrul lentilei oculare.

➤ Expunerea larvelor (72 hpf) de *Danio rerio*

Expunerea a început la vârsta de 72 hpf și s-a încheiat la 168 hpf, fiecare condiție experimentală incluzând $n = 10$ organisme. Organismele au fost expuse individual, câte unul în fiecare godeu, în plăci de 24 de godeuri, iar mediul de expunere E3 a fost reînnoit zilnic.

Pe întreaga durată a experimentului, organismele au fost menținute în condiții controlate, la o temperatură de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, cu un ciclu de lumină/întuneric de 14:10 h, într-o cameră climatică Mikrotest. Pentru a asigura stabilitatea condițiilor experimentale, mediul de cultură a fost schimbat la fiecare 24 h, pe toată durata expunerii.

Evaluările au fost realizate la intervale de 24 h, cu monitorizarea la stereomicroscop a punctelor cheie de dezvoltare; la 48 hpf a fost analizată frecvența cardiacă, la 72 hpf a fost evaluată rata de eclozare, iar la 168 hpf a fost analizat comportamentul larvelor în condiții de lumină, respectiv de întuneric, urmat de fotografierea acestora cu o cameră cu ocular DinoEye pentru efectuarea măsurătorilor biometrice, incluzând lungimea totală, distanța interoculară și diametrul lentilei oculare.

➤ Expunerea adulților (6 luni) de *Danio rerio*

În experimente au fost utilizate exemplare adulte de pești zebră (*Danio rerio*), linia genetică AB, cu vârsta de 6 luni, cu o masă corporală medie de $0,73 \pm 0,1\text{ g}$ și o lungime medie de $38 \pm 4\text{ mm}$. Peștii au fost achiziționați de la un furnizor local autorizat din Iași, România, și au fost acomodați la condițiile de laborator timp de 14 zile într-un acvariu de 92 L ($60 \times 30 \times 45\text{ cm}$; $L \times l \times h$), anterior desfășurării testelor.

Specimene de ambele sexe au fost menținute împreună, cu un raport aproximativ de 1:1, iar între acvariile de menținere au fost plasate separatoare din hârtie albă, pentru a reduce

interacțiunile vizuale și factorii de stres externi. Testările comportamentale au fost efectuate într-o sală dedicată, în intervalul orar 09:00–17:00, speciile fiind evaluate în mod individual, câte un pește din fiecare grup fiind testat zilnic, într-o ordine randomizată, în funcție de condiția de expunere. Pe durata experimentului, peștii au fost hrăniți de două ori pe zi cu hrană comercială uscată (fulgi TetraMin™), într-o cantitate echivalentă cu aproximativ 1% din masa corporală pe zi, iar condițiile de mediu au fost menținute constante, conform protocoalelor descrise anterior (Jijie et al., 2020; Paduraru et al., 2024). Pentru a asigura stabilitatea condițiilor experimentale, mediul de cultură a fost schimbat la fiecare 24 h, pe toată durata expunerii.

La finalul perioadei experimentale (96 h), pe lângă evaluările comportamentale, exemplarele de pește zebură au fost supuse și unei analize biochimice pentru investigarea răspunsurilor fiziologice induse de expunere.

2.4. Expunerea la substanțe farmaceutice în amestec cu micro-nanoplastice

2.4.1. Substanțele și materialele utilizate

Kp în formă lichidă (50 mg mL⁻¹), identic cu cel utilizat în experimentele anterioare, a fost folosit ca substanță farmaceutică pentru evaluarea efectelor antiinflamatoarelor nesteroidiene asupra organismelor acvatice. Soluțiile stoc au fost preparate prin diluare în apă distilată, urmată de omogenizare prin agitare.

MNPL utilizate în studiu au fost reprezentate de PP și PLA, selectate datorită utilizării lor extinse în ambalaje, textile și materiale biodegradabile. Particulele de PLA au fost sub formă de MNPL, iar caracterizarea lor structurală a fost realizată prin spectroscopie FTIR, utilizând echipamentul μ -FTIR Lumos II de la Bruker (Germania) în ATR (cristal de Ge), prevăzut cu librării spectrale precum BPAD Bruker Polymer ATR Library, Library KIMW ATR-IR Polymer, BIBL ATR-FTIR-Library Complete, în domeniul spectral 4000 – 680 cm⁻¹, cu o rezoluție de 4 cm⁻¹ și o acumulare de 64 scanări. Controlul echipamentului și achiziția spectrelor IR s-a realizat cu ajutorul softului Opus.

Analiza morfologiei MPL s-a realizat prin microscopie electronică de baleiaj (SEM), utilizând echipamentul HITACHI S-3400 N (Hitachi Science Systems, Tokyo, Japonia) și prin microscopie optică, utilizând un stereomicroscop clasic (Celestron), pentru a confirma compoziția chimică, dimensiunea și morfologia suprafeței.

Pentru PP au fost utilizate două tipuri de fracții granulometrice, adaptate stadiului de dezvoltare a organismelor expuse. În cazul embrionilor și larvelor de *Danio rerio* s-au folosit particule micro-nano, adecvate pentru a reproduce scenarii realiste de ingestie și contact la stadii timpurii de dezvoltare. Pentru adulți, expunerea s-a realizat cu MPL sub formă de fibre de PP cu dimensiuni sub 1 mm. Ambele tipuri de MNPL au fost caracterizate prin spectroscopie în infraroșu cu transformare Fourier (FTIR) și SEM, pentru confirmarea identității materialului, respectiv PLA și a proprietăților de suprafață.

2.4.2. Expunerea simplă și în amestec la ketoprofen și micro-nanoplastice de polipropilenă

➤ Expunerea embrionilor (5 hpf) de *Danio rerio*

Expunerea a început la vârsta de 5 hpf și s-a încheiat la 120 hpf, organismele fiind evaluate la intervale de 24 h, cu monitorizarea la stereomicroscop a punctelor-cheie de dezvoltare. Pe întreaga durată a experimentului, organismele au fost menținute în condiții controlate, într-o cameră de creștere etanșă, la o temperatură de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, cu un ciclu de lumină/întuneric de 14:10 h. Pentru a asigura stabilitatea condițiilor experimentale, mediul de cultură a fost schimbat la fiecare 48 h, pe toată durata expunerii. La 48 hpf au fost monitorizată frecvența cardiacă, la 72 hpf a fost evaluată rata de eclozare, iar la 120 hpf a fost analizat comportamentul larvelor în condiții de lumină, respectiv de întuneric, urmat de fotografierea acestora cu o cameră cu ocular DinoEye pentru efectuarea măsurătorilor biometrice, incluzând lungimea totală, distanța interoculară și diametrul lentilei oculare.

➤ Expunerea larvelor (72 hpf) de *Danio rerio*

Expunerea larvară a început la vârsta de 72 hpf și s-a încheiat la 192 hpf, organismele fiind evaluate la intervale de 24 h, cu monitorizarea la stereomicroscop a punctelor-cheie de dezvoltare. Pe întreaga durată a experimentului, organismele au fost menținute în condiții controlate, într-o cameră de creștere etanșă, la o temperatură de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, cu un ciclu de lumină/întuneric de 14:10 h. Pentru a asigura stabilitatea condițiilor experimentale, mediul de cultură a fost schimbat la fiecare 48 h, pe toată durata expunerii.

Analiza comportamentală a fost realizată în perioadele de lumină, respectiv de întuneric, iar la finalul experimentului, larvele au fost fotografiate cu o cameră cu ocular DinoEye pentru

efectuarea măsurătorilor biometrice, incluzând lungimea totală, distanța interoculară și diametrul lentilei oculare.

➤ Expunerea adulților (8 luni) de *Danio rerio*

S-au utilizat exemplare adulte de pește zebură (*Danio rerio*), linia genetică AB, cu vârsta de 8 luni, având o masă corporală medie de $0,73 \pm 0,1$ g și o lungime medie de 39 ± 3 mm. Peștii au fost achiziționați de la un furnizor local autorizat din Iași, România, și acomodați la condițiile de laborator timp de 14 zile într-un acvariu de 92 L ($60 \times 30 \times 45$ cm; $L \times l \times h$), anterior desfășurării experimentului. Specimene de ambele sexe au fost menținute împreună, cu un raport aproximativ de 1:1, iar între acvariile de menținere au fost plasate separatoare din hârtie albă, pentru a reduce interacțiunile vizuale și factorii de stres externi.

Ulterior, peștii au fost expuși timp de 96 h la Kp, MNPL de PP și la amestecul binar (Kp și PP). Testările comportamentale au fost efectuate într-o sală dedicată, în intervalul orar 09:00–17:00, speciile fiind evaluate în mod individual, câte un pește din fiecare grup fiind testat zilnic, într-o ordine randomizată în funcție de condiția de expunere. Pe durata experimentului, peștii au fost hrăniți de două ori pe zi cu hrană comercială uscată (fulgi TetraMin™) într-o cantitate echivalentă cu aproximativ 2% din masa corporală pe zi, iar condițiile de mediu au fost menținute constante, conform protocoalelor descrise anterior (Jijie et al., 2020; Paduraru et al., 2024). Pentru asigurarea stabilității condițiilor experimentale și a unei expunerii controlate, apa din toate condițiile experimentale a fost reînnoită total la intervale de 24 h, pe întreaga durată a expunerii.

2.4.3. Expunerea simplă și în amestec la ketoprofen și micro-nanoplastice de acid polilactic

➤ Expunerea embrionilor (5 hpf) de *Danio rerio*

Expunerea a început la vârsta de 5 hpf și s-a încheiat la 120 hpf, organismele fiind evaluate la intervale de 24 h, cu monitorizarea la stereomicroscop a punctelor-cheie de dezvoltare. Pe întreaga durată a experimentului, organismele au fost menținute în condiții controlate, într-o cameră de creștere etanșă, la o temperatură de $28 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, cu un ciclu de lumină/întuneric de 14:10 h. Pentru a asigura stabilitatea condițiilor experimentale, mediul de cultură a fost schimbat la fiecare 48 h, pe toată durata expunerii. La 48 hpf au fost monitorizate bătăile cardiace, la 72 hpf a fost evaluată rata de eclozare, iar la 120 hpf a fost analizat comportamentul larvelor în condiții de lumină, respectiv de întuneric, urmat de fotografierea

acestora cu o cameră cu ocular DinoEye pentru efectuarea măsurătorilor biometrice, incluzând lungimea totală, distanța interoculară și diametrul lentilei oculare.

➤ Expunerea larvelor (72 hpf) de *Danio rerio*

Expunerea larvară a început la vârsta de 72 hpf și s-a încheiat la 192 hpf, organismele fiind evaluate la intervale de 24 h, cu monitorizarea la stereomicroscop a punctelor-cheie de dezvoltare. Pe întreaga durată a experimentului, organismele au fost menținute în condiții controlate, într-o cameră de creștere etanșă, la o temperatură de $28^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, cu un ciclu de lumină/întuneric de 14:10 h. Pentru a asigura stabilitatea condițiilor experimentale, mediul de cultură a fost schimbat la fiecare 48 h, pe toată durata expunerii. Analiza comportamentală a fost realizată în perioadele de lumină, respectiv de întuneric, iar la finalul experimentului, larvele au fost fotografiate cu o cameră cu ocular DinoEye pentru efectuarea măsurătorilor biometrice, incluzând lungimea totală, distanța interoculară și diametrul lentilei oculare.

➤ Expunerea adulților (8 luni) de *Danio rerio*

S-au utilizat exemplare adulte de pește zebură (*Danio rerio*), linia genetică AB, cu vârsta de 8 luni, având o masă corporală medie de $0,72 \pm 0,1$ g și o lungime medie de 40 ± 3 mm. Peștii au fost achiziționați de la un furnizor local autorizat din Iași, România, și acomodați la condițiile de laborator timp de 14 zile într-un acvariu de 92 L ($60 \times 30 \times 45$ cm; $L \times l \times h$), anterior desfășurării experimentului. Specimene de ambele sexe au fost menținute împreună, cu un raport aproximativ de 1:1, iar între acvariile de menținere au fost plasate separatoare din hârtie albă, pentru a reduce interacțiunile vizuale și factorii de stres externi.

Ulterior, peștii au fost expuși timp de 96 h la Kp, MNPL de PLA și la amestecul binar (Kp și PLA). Testările comportamentale au fost efectuate într-o sală dedicată, în intervalul orar 09:00–sexe au fost menținute împreună, cu un raport aproximativ de 1:1, iar între acvariile de testare au fost plasate separatoare din hârtie albă, pentru reducerea interacțiunilor vizuale și a factorilor de stres externi. Ulterior, peștii au fost expuși timp de 96 h la Kp, PLA și la amestecul acestora. Testările comportamentale au fost efectuate într-o sală dedicată, în intervalul orar 09:00–17:00, speciemenle fiind evaluate comportamental în mod individual, câte un pește din fiecare grup fiind testat zilnic, într-o ordine randomizată în funcție de condiția de expunere. Pe durata experimentului, peștii au fost hrăniți de două ori pe zi cu hrană comercială uscată (fulgi TetraMin™), într-o cantitate echivalentă cu aproximativ 1% din masa corporală pe zi, iar condițiile de mediu au fost menținute constante, conform protocoalelor descrise anterior (Jijie

et al., 2020; Paduraru et al., 2024). Pentru asigurarea stabilității condițiilor experimentale și a unei expunerii controlate, mediul de cultură a fost reînnoit la intervale de 24 h, pe întreaga durată a expunerii.

2.5. Testele efectuate

➤ Testul de lumină/întuneric

În această teză s-a urmărit și expunerea stadiilor incipiente (embrioni și larve) la substanțe farmaceutice și MNPL, fapt ce a necesitat pregătirea pentru reproducere a adulților de pește zebră, pentru obținerea embrionilor.

După expunerea la substanțele și compușii utilizați în cadrul experimentelor s-a efectuat testul de lumină/întuneric pe larvele de *Danio rerio*. În cadrul acestui test, după o perioadă de acomodare în faza de lumină ambientală (2 min), alternanța bruscă dintre fazele de lumină și întuneric poate declanșa un răspuns de stres asemănător anxietății.

➤ Testul acvariului nou

Pentru evaluarea comportamentului exploratoriu s-a utilizat un acvariu rectangular (30 cm × 20 cm × 17 cm, lungime × lățime × înălțime), umplut cu 6 L de apă de la robinet, declorinată. Două camere video au fost poziționate ortogonal pentru a obține simultan o vedere de sus și una frontală a mișcărilor peștilor. În plus, pereții laterali și partea superioară a acvariului au fost împărțiți în două zone distincte. Comportamentul exploratoriu al fiecărui exemplar adult de pește zebră a fost înregistrat și analizat cu ajutorul software-ului EthoVision XT, versiunea 16 (Noldus Information Technology, Wageningen, Țările de Jos).

➤ Testul de preferință socială

Experimentul a fost realizat într-un labirint în formă de T (70 cm × 50 cm × 10 cm, lungime × lățime × înălțime), împărțit în cinci zone: brațul stâng, zona de decizie, brațul drept, brațul de start și zona conspecificilor, separate printr-un perete transparent din plastic. Labirintul a fost umplut cu 5 L de apă, iar în zona conspecificilor, situată la capătul brațului stâng, au fost plasați alți trei pești. Pentru peștii supuși experimentelor s-au înregistrat timpul petrecut în fiecare zonă și frecvența intrărilor în zona de decizie, precum și în brațele stâng, drept și de start,

utilizând același software ca în testul tridimensional al acvariului nou (EthoVision XT, versiunea 16).

2.6. Evaluarea stresului oxidativ și activitatea acetilcolinesterazei

După finalizarea analizei comportamentale, exemplarele adulte de pește zebură au fost eutanasiate prin metoda șocului hipotermic (2 – 4 °C), într-un pahar Berzelius cu apă și gheață, conform recomandărilor din ghidurile AVMA. După confirmarea absenței semnelor vitale, fiecare specimen a fost omogenizat, utilizând un set de pistil și mojar KIMBLE Dounce de 7 mL (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SUA), în soluție tampon fosfat salină (PBS) 0,1 M, pH 7,4, răcită pe gheață, într-o proporție de 10% (w/v). Ulterior, probele au fost centrifugate la 5500 rpm, timp de 15 minute, la 4 °C iar supernatantul obținut a fost utilizat pentru analize biochimice. Conținutul proteic a fost determinat prin metoda Bradford.

Activitatea AChE a fost determinată conform metodei descrise de Boianiu și colaboratorii (Boianiu et al., 2021), cu modificări minore. Pentru fiecare probă independentă, două creiere de pești au fost omogenizate în zece volume de tampon de extracție, urmate de centrifugare la 14.000 rpm, timp de 10 minute, la 4 °C. Din supernatant, 50 µL au fost amestecați cu 450 µL tampon fosfat de sodiu (pH 7,4; 0,25 M), 50 µL DTNB (1 mM) și 25 µL ATCh (5 mM). După incubare, timp de 10 minute la 37 °C, reacția a fost oprită prin adăugarea a 900 µL acetonă iar absorbanta a fost măsurată la 412 nm, utilizând spectrofotometrul Specord 210 Plus (Analytik Jena, Germania). Activitatea AChE a fost exprimată ca nanomoli de ATCh hidrolizați pe minut, per mg proteină.

2.7. Analiza statistică a datelor

Normalitatea distribuției datelor a fost verificată utilizând testul Shapiro–Wilk, implementat în GraphPad Prism, versiunea 10.4.1 (San Diego, CA, SUA). Pentru identificarea valorilor extreme semnificative a fost aplicată metoda ROUT, astfel încât seturile de date să fie curate și adecvate analizelor ulterioare. Rezultatele au fost exprimate ca medii ± deviația standard (SD) iar pragul de semnificație statistică a fost stabilit la $p < 0,05$.

Pentru embrioni și larve, evaluarea efectelor tratamentelor în fazele de lumină și întuneric a fost realizată inițial printr-o analiză ANOVA unifactorială (one-way ANOVA),

urmată de testul post-hoc Dunnett, pentru a identifica diferențele dintre grupurile tratate și control în fiecare fază separat, utilizând un interval de încredere de 95%. Ulterior, pentru a evidenția diferențele statistice dintre faza de lumină și cea de întuneric, a fost aplicată o analiză ANOVA bifactorială (two-way ANOVA), urmată de testul post-hoc Šidák, utilizând același interval de încredere de 95%.

În cazul adulților de *Danio rerio*, analiza statistică a fost realizată exclusiv pentru perioada de lumină. Diferențele dintre grupurile experimentale și grupul martor au fost evaluate printr-o analiză a varianței unifactoriale (one-way ANOVA), urmată de testul post-hoc Dunnett. În experimentele în care a fost necesară evaluarea tuturor comparațiilor posibile între grupuri, a fost aplicat testul post-hoc Tukey, utilizând un interval de încredere de 95%. Pentru a investiga relația dintre parametrii comportamentali și cei biochimici, a fost realizată analiza corelației Pearson, cu un interval de încredere de 95%, permițând evaluarea asocierilor dintre variabilele măsurate.

Determinarea concentrațiilor letale și subletale pentru embrioni și larve a fost efectuată prin analiza Probit. Rezultatele testelor de toxicitate acută au fost exprimate sub formă de valori LC_{50} și EC_{50} , însoțite de limite de încredere de 95%. Parametrii utilizați în calculul acestor valori au inclus mortalitatea, eclozarea și anomaliile observate.

Dimensiunea minimă a eșantionului necesară pentru detectarea unui efect de mărime medie a fost estimată utilizând software-ul G*Power, versiunea 3.1.9.7 (Universitatea din Düsseldorf, Germania), setând nivelul de semnificație $\alpha = 0,05$ și o putere statistică de 80%.

Asocierea pereche dintre variabilele comportamentale a fost examinată folosind coeficientul de corelație Pearson (r). Corelațiile au fost calculate între fiecare parametru de înot și parametrii preferinței sociale, respectiv ai analizelor biochimice.

Toate variabilele au fost verificate mai întâi pentru normalitate și liniaritate, pentru a confirma adecvarea utilizării metodei Pearson. Dimensiunea eșantionului ($n = 20/n = 40$) pentru fiecare corelație a corespuns numărului total de pești cu date complete pentru cele două variabile comparate. Coeficienții de corelație și valorile p asociate au fost calculați folosind întregul set de date, fără a agrega rezultatele între tratamente, permițând evaluarea relațiilor continue independent de apartenența la grup. Semnificația statistică a fost evaluată la $\alpha = 0,05$.

CAPITOLUL 3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.1. Studiul experimental nr. 1: Efectele individuale și combinate ale ibuprofenului și acidului valproic asupra dezvoltării și comportamentului peștilor zebură

Scopul studiului a fost evaluarea efectelor expunerii peștilor zebură la concentrații relevante pentru mediu de Ibu ($20 \mu\text{g L}^{-1}$), VPA ($3 \mu\text{g L}^{-1}$) și la amestecul dintre acestea.

Expunerea a fost realizată pe trei stadii de dezvoltare - embrionar (5 hpf), larvar (72 hpf) și adulți de 8 luni - fiecare expunere având o durată de 96 de ore, pentru a surprinde răspunsurile specifice fiecărei etape ontogenetice.

3.1.1. Expunerea embrionilor (5 hpf) de *Danio rerio*

➤ Frecvența cardiacă și parametrii biometrici măsurați

În urma expunerii embrionilor la Ibu, VPA și la amestecul celor două nu s-au observat diferențe semnificative statistic cu privire la frecvența cardiacă, lungimea totală și distanța interoculară, comparativ cu grupul de control ($p > 0,05$) - Fig. III.1.(a), (b), (c).

În ceea ce privește diametrului lentilei oculare nu s-au observat efecte semnificative pentru grupul tratat cu Ibu ($p > 0,05$) și VPA ($p > 0,05$), însă s-a observat o scădere semnificativă statistic în cazul grupului tratat cu Ibu + VPA ($p = 0,022$), față de grupul de control - Fig. III.1.(d).

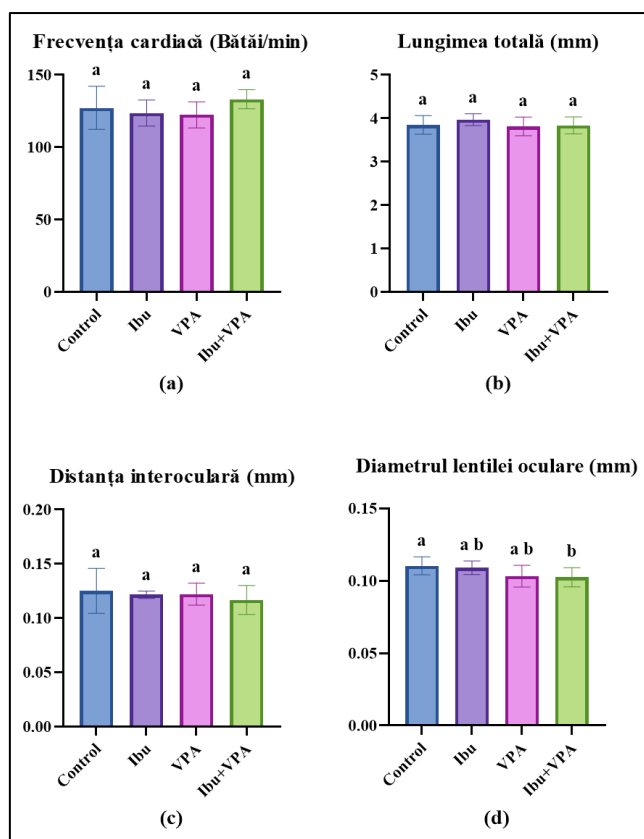


Fig. III.1. Frecvența cardiacă și parametrii biometrici măsurați la stadiul embrionar (5 hpf) de *Danio rerio*, expus timp de 96 h la produse farmaceutice individuale și amestecuri (Ibu = 20 $\mu\text{g L}^{-1}$; VPA = 3 $\mu\text{g L}^{-1}$). Parametrii urmăriți includ: (a) frecvența cardiacă, (b) lungimea totală, (c) distanța interoculară, (d) diametrul lentilei oculare. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD ($n = 10$ animale pe grup) și au fost analizate utilizând ANOVA unidirecțională, urmată de testul Tukey. Literele comune indică grupurile care nu diferă semnificativ statistic între ele.

3.1.2. Expunerea larvelor (72 hpf) de *Danio rerio*

➤ Măsurătorile biometrice realizate la stadiul larvar

În cazul expunerii larvelor (72 hpf) la substanțele farmaceutice simple și în amestec, nu s-au observat diferențe semnificative statistic pentru parametrii urmăriți ($p > 0,05$) - Fig. III.3.

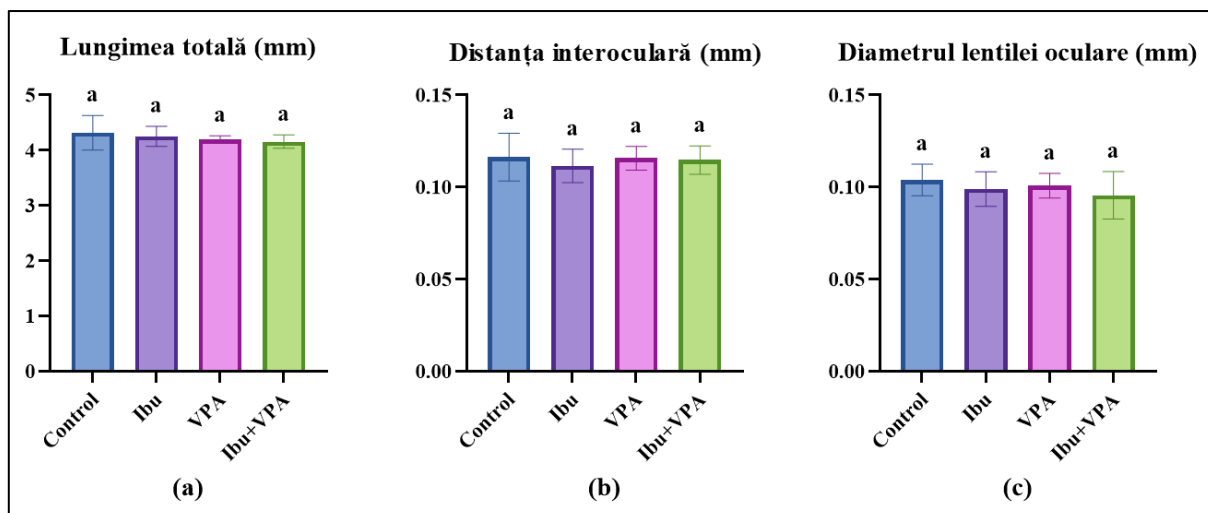


Fig. III.3. Măsurătorile biometrice realizate la stadiul larvar (72 hpf) de *Danio rerio*, expus timp de 96 h la produse farmaceutice individuale și amestecuri (Ibu = 20 $\mu\text{g L}^{-1}$; VPA = 3 $\mu\text{g L}^{-1}$). Parametrii urmăriți includ: (a) lungimea totală, (b) distanța interoculară, (c) diametrul lentilei oculare. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD ($n = 10$ animale pe grup) și au fost analizate utilizând ANOVA unidirecțională, urmată de testul Tukey. Literele comune indică grupurile care nu diferă semnificativ statistic între ele.

3.1.3. Expunerea adulților (8 luni) de *Danio rerio*

➤ Testul acvariului nou

În testul acvariului nou, din perspectivă laterală, grupul tratat cu VPA a parcurs o distanță totală semnificativ mai mare decât grupul de control ($p = 0,025$) - Fig. III.6.(a). În cazul timpului de imobilitate, s-a observat o creștere semnificativă a acestuia pentru grupul tratat cu Ibu ($p = 0,009$), față de cel tratat cu Ibu+VPA - Fig. III.6.(b). Grupul tratat cu Ibu+VPA a petrecut semnificativ mai puțin timp în zona superioară a acvariului, comparativ cu toate celelalte grupuri tratate, inclusiv față de control ($p < 0,001$) - Fig. III.6.(c).

De asemenea, grupul tratat cu Ibu+VPA a petrecut semnificativ mai mult timp în jumătatea inferioară, comparativ cu toate celelalte grupuri ($p < 0,001$) - Fig. III.6.(d). În ceea ce privește rotațiile în sens orar, s-a observat o creștere semnificativă în cazul grupului tratat cu Ibu+VPA, în raport cu grupul de control ($p = 0,017$) și cel tratat cu Ibu ($p = 0,032$) - Fig. III.6.(e). Nu s-au observat diferențe semnificative statistic în cazul rotațiilor în sens antiorar ($p > 0,005$) - Fig. III.6.(f).

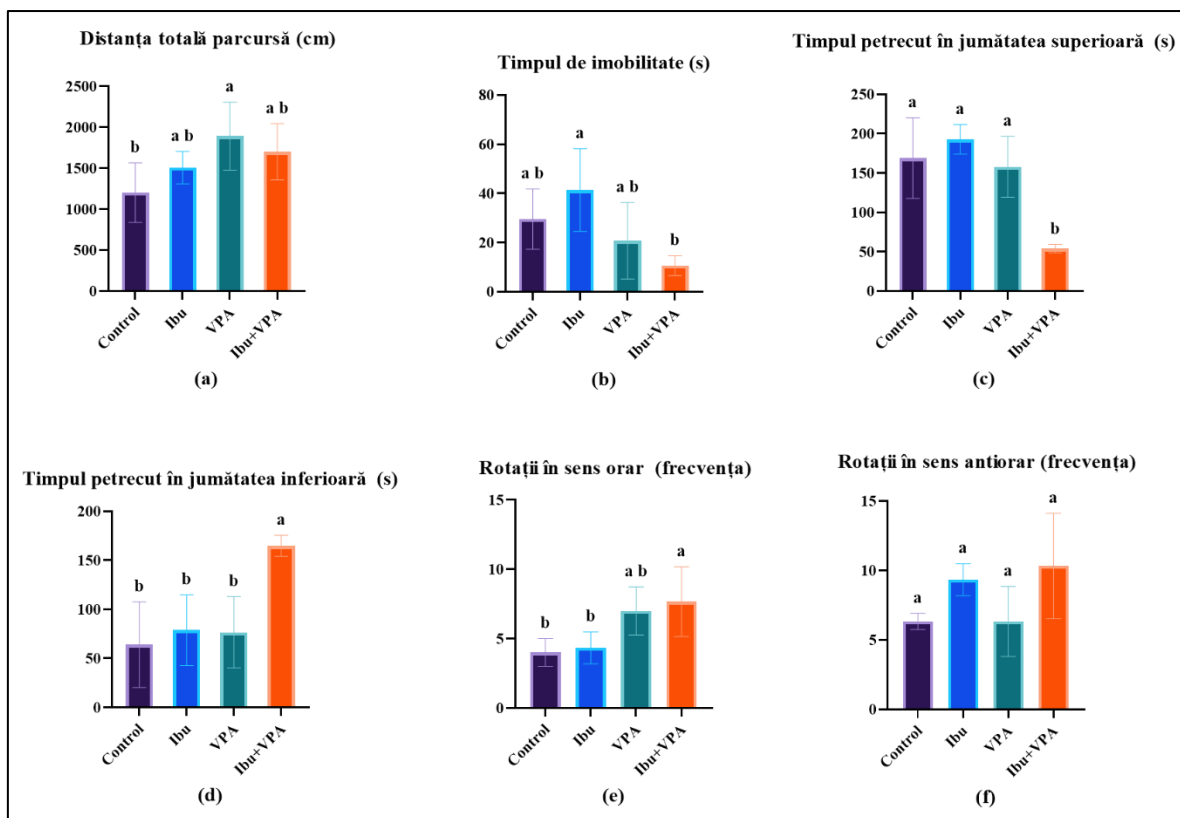


Fig. III.6. Efectele expunerii la ibuprofen (Ibu) și acid valproic (VPA), individual și în amestec (Ibu = 20 $\mu\text{g L}^{-1}$; VPA = 3 $\mu\text{g L}^{-1}$) asupra locomoției adulților de pește zebură. Parametrii comportamentali măsurați includ: (a) distanța totală parcursă (cm), (b) timpul de imobilitate (s), (c) timpul petrecut în jumătatea superioară, (d) timpul petrecut în jumătatea inferioară (s), (e) rotații în sens orar (frecvența), (f) rotații în sens antiorar (frecvența). Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD ($n = 5$ animale pe grup, cu un sex ratio 3:2 masculi/femele) și au fost analizate utilizând ANOVA unidirecțională, urmată de testul Tukey. Literale comune indică grupurile care nu diferă semnificativ statistic între ele.

3.1.4. Discuții asupra studiului

Studiul a evidențiat că expunerea la concentrații relevante pentru mediu de ibuprofen (Ibu) și acid valproic (VPA) determină la *Danio rerio* efecte comportamentale dependente de stadiul de dezvoltare, în timp ce expunerea combinată produce frecvent răspunsuri neaditive, predominant antagonice. La embrioni și larve nu au fost observate modificări semnificative ale principalilor parametri morfologici (frecvență cardiacă, lungime totală, distanță interoculară), sugerând absența unei toxicități generale evidente. Totuși, VPA și amestecul Ibu+VPA au redus diametrul lentilei oculare la embrioni, indicând o posibilă afectare subtilă a funcției vizuale. În

paralel, modificările comportamentale au fost mai sensibile decât indicatorii morfologici, fiind observate schimbări ale distanței parcurse, timpului de activitate și comportamentului dependent de lumină și întuneric.

La stadiile timpurii de dezvoltare, VPA a determinat modificări ale activității locomotorii și ale răspunsurilor comportamentale asociate stresului, în timp ce Ibu a redus activitatea în condiții de lumină și a indus răspunsuri compensatorii în întuneric. Creșterea preferinței pentru marginea godeurilor, în special în timpul întunericului, sugerează apariția unor răspunsuri anxiogene precoce. În schimb, expunerea combinată nu a generat efecte cumulative evidente asupra activității locomotorii, ceea ce susține existența unor interacțiuni antagonice între cei doi compuși. Aceste rezultate indică faptul că efectele contaminanților farmaceutici se manifestă în principal la nivel funcțional și neurocomportamental, înaintea apariției unor modificări morfologice evidente.

La peștii adulți, expunerea la Ibu și Ibu+VPA a modificat comportamentul explorator, iar VPA a afectat semnificativ preferința socială, determinând reducerea interacțiunilor cu conspecificii și sugerând alterări neurocomportamentale persistente. În ansamblu, rezultatele demonstrează că expunerea la concentrații ecologic relevante de Ibu și VPA poate influența comportamentul peștilor zebra pe parcursul ontogenezei, de la embrioni până la adulți, în timp ce efectele amestecului sunt dificil de anticipat din cauza interacțiunilor antagonice dintre compuși. Aceste observații evidențiază importanța evaluării contaminanților farmaceutici pe întregul ciclu de dezvoltare și a includerii efectelor de amestec în evaluările ecotoxicologice.

3.2. Studiul experimental nr. 2: Efectele individuale și combinate ale meropenemului, acidului valproic și ketoprofenului asupra dezvoltării și comportamentului peștilor zebra

Scopul studiului a fost evaluarea efectelor concentrațiilor relevante pentru mediu de meropenem (Mp), acid valproic (VPA), ketoprofen (Kp) și ale amestecurilor acestora asupra peștelui zebra (*Danio rerio*) în stadiile embrionar, larvar și adult. La embrioni și larve au fost analizați parametrii de dezvoltare, toxicitate și comportament locomotor în condiții de lumină și întuneric, incluzând mortalitatea, malformațiile, măsurători biometrice și activitatea de înot. La adulți, după 96 h de expunere, au fost evaluate comportamentele exploratorii, anxioase și sociale prin testul acvariului nou și testul de preferință socială. De asemenea, au fost determinați

markerii stresului oxidativ (SOD, MDA, GPx) și activitatea acetilcolinesterazei (AChE), iar relațiile dintre răspunsurile comportamentale și biochimice au fost investigate prin analiza corelațiilor Pearson.

3.2.1. Expunerea embrionilor (5 hpf) de *Danio rerio*

➤ Frecvența cardiacă și parametrii biometrici măsurați

Expunerea embrionilor la substanțe antiinflamatoare (Kp), antibiotice (Mp) și antiepileptice (VPA), prin administrare simplă sau în amestecuri binare și ternare s-a realizat timp de 96 h, având ca țintă observarea unor parametri cheie pentru stadiile incipiente ale peștilor zebură, parametri prezentați în Fig. III.10.: frecvența cardiacă (a), lungimea totală (b), distanța interoculară (c) și diametrul lentilei oculare (d).

Nu s-au observat diferențe relevante statistic cu privire la frecvența cardiacă între grupul de control și celelalte grupuri tratate cu produse farmaceutice ($p > 0,05$) - Fig. III.10.(a). Cu toate acestea, în cazul embrionilor expuși la Mp s-a observat o creștere semnificativă, în comparație cu amestecurile binare cu Mp+VPA și VPA+Kp ($p < 0,05$) și cu grupul de tratament ternar ($p < 0,01$) - Fig. III.10.(a).

În ceea ce privește lungimea totală a organismelor din momentul finalizării expunerii (96 h), nu s-au observat diferențe relevante statistic ($p > 0,05$) - Fig. III.10.(b). Totuși, pentru distanța interoculară s-au observat diferențe relevante statistic între grupul de control și celelalte grupuri tratate cu substanțe farmaceutice, constând într-o scădere semnificativă între grupul de control vs. Mp și Mp+VPA ($p < 0,05$) și grupul de control vs. VPA+Kp și Mp+Kp ($p < 0,01$) și între grupul de control vs. VPA, Kp și VPA+Mp+Kp ($p < 0,001$) - Fig. III.10.(c).

Pentru o evaluare mai detaliată, a fost analizat diametrul lentilei oculare, unde s-a observat o scădere semnificativă statistic, comparativ cu grupul de control, mai precis control vs. VPA, control vs. Kp, control vs. Mp+VPA, control vs. VPA+Kp ($p < 0,01$). Nu s-au înregistrat diferențe relevante statistic pentru comparațiile dintre grupul de control vs. grupul expus la Mp, control vs. grupul expus la Mp+Kp și control vs. grupul expus la VPA+Mp+Kp ($p > 0,05$) - Fig. III.10.(d).

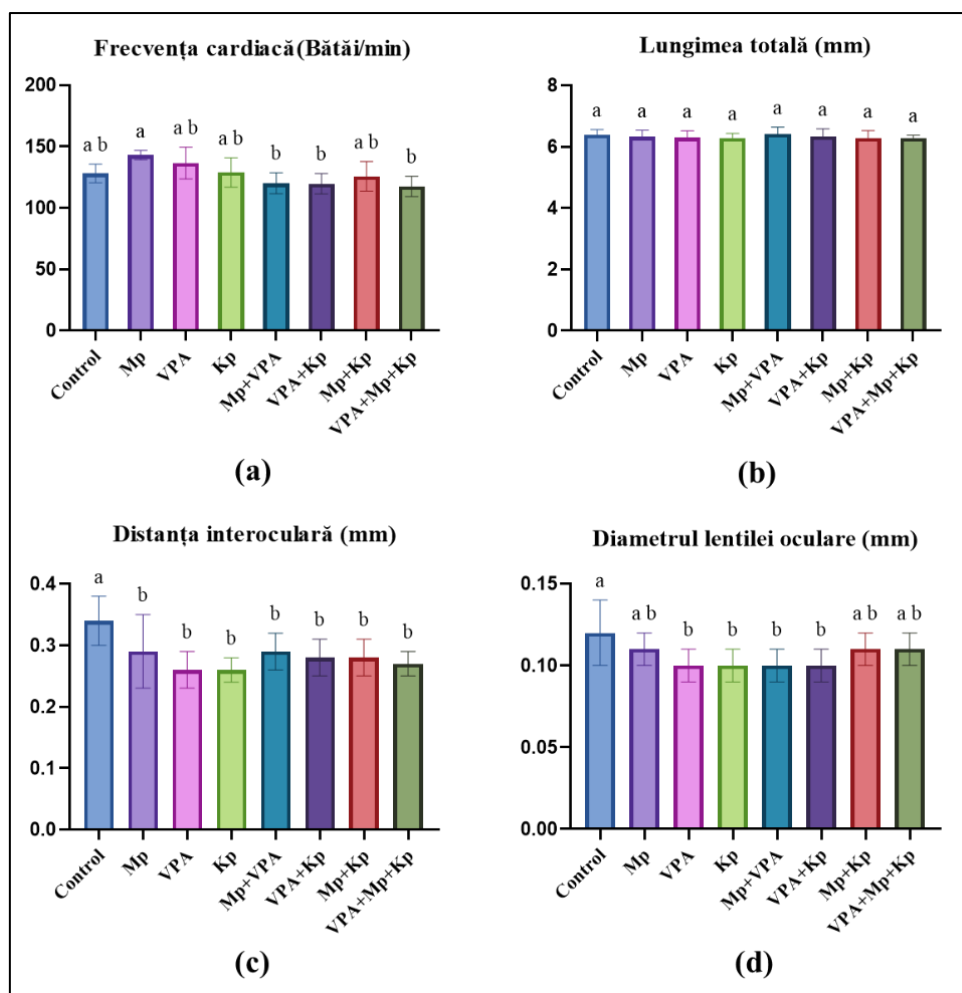


Fig. III.10. Frecvența cardiacă și parametrii biometrici măsurați la stadiul embrionar (5 hpf) al speciei *Danio rerio*, expus timp de 96 h la produse farmaceutice individuale și în amestecuri (Mp = 1 $\mu\text{g L}^{-1}$; VPA = 3 $\mu\text{g L}^{-1}$; Kp = 5 $\mu\text{g L}^{-1}$). Parametrii urmăriți includ: (a) frecvența cardiacă (bătăi/min), (b) lungimea totală (mm), (c) distanța interoculară (mm), (d) diametrul lentilei oculare (mm). Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD ($n = 10$ animale pe grup) și au fost analizate utilizând ANOVA unidirecțională, urmată de testul Tukey. Literale comune indică grupurile care nu diferă semnificativ statistic între ele.

3.2.2. Expunerea larvelor (72 hpf) de *Danio rerio*

➤ Măsurătorile biometrice realizate la stadiul larvar

Expunerea larvelor (72 hpf) de *Danio rerio* la substanțe antiinflamatoare (Kp), antibiotice (Mp) și antiepileptice (VPA), administrate individual sau în amestecuri binare și ternare, s-a realizat timp de 96 h. Acest stadiu de dezvoltare este de interes, deoarece organismele nu mai sunt protejate de corion, fiind în contact direct cu poluanții farmaceutici

studiați. Astfel, s-au urmărit parametri cheie pentru acest stadiu, precum este prezentat în Fig. III.12., mai precis: lungimea totală (a), distanța interoculară (b) și diametrul lentilei oculare (c).

Referitor la lungimea totală a larvelor la finalul expunerii de 96 h la substanțele farmaceutice administrate individual sau în amestec, raportat la grupul de control, nu s-au observat modificări semnificative statistic ($p > 0,05$) - Fig. III.12.(a). Pe de altă parte, peștii din grupul tratat cu Mp au prezentat o scădere semnificativă statistic, față de peștii din grupurile expuse la Kp, Mp+VPA, VPA+Kp, Mp+Kp ($p < 0,01$) - Fig. III.12.(a). În ceea ce privește distanța interoculară a larvelor tratate cu substanțe farmaceutice, s-a constatat faptul că față de organisme din grupul de control, cele din grupurile Mp+VPA și Mp+Kp nu au prezentat diferențe relevante statistic - Fig. III.12.(b). Însă, grupurile tratate cu Mp, respectiv VPA au prezentat o scădere semnificativă statistic, față de grupul de control ($p < 0,01$) și, mai mult decât atât, o diferență mai pronunțată s-a observat față de grupul tratat cu Kp ($p < 0,001$) - Fig. III.12.(b). În același timp, grupul tratat cu Kp a arătat cea mai mare scădere dintre toate tratamentele, evidențiind o relevanță statistică față de grupurile expuse la Mp+Kp, VPA+Mp+Kp ($p < 0,05$), respectiv Mp+VPA ($p < 0,01$) - Fig. III.12.(b). Pentru diametrul lentilei oculare, grupul tratat cu Mp+Kp a înregistrat o creștere semnificativă statistic, față de grupul de control ($p < 0,05$) - Fig. III.12.(c). Grupul expus la Mp+Kp ($p < 0,05$) a prezentat o creștere semnificativă statistic și comparativ cu grupul tratat cu Mp. De asemenea, grupurile expuse la Kp, respectiv Mp+Kp ($p < 0,001$) și VPA+Mp+Kp ($p < 0,05$) au prezentat o creștere semnificativă statistic, față de grupul expus la VPA. Amestecul binar de Mp+VPA a determinat o scădere a diametrului lentilei oculare, față de grupul expus la Mp+Kp ($p < 0,01$) - Fig. III.12.(c).

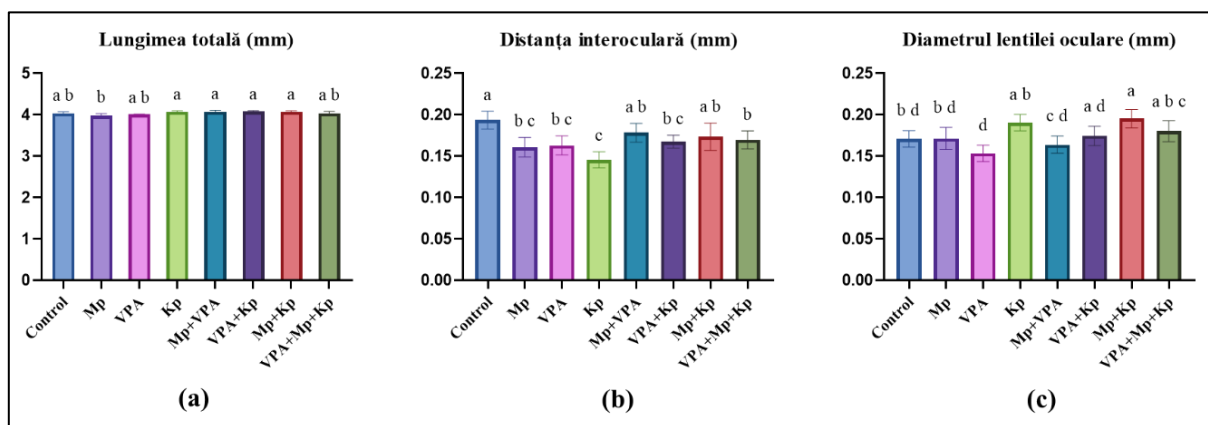


Fig. III.12. Măsurătorile biometrice realizate la stadiul larvar (72 hpf) al speciei *Danio rerio*, expus timp de 96 h la produse farmaceutice individuale și în amestecuri ($Mp = 1 \mu g L^{-1}$; $VPA = 3 \mu g L^{-1}$; $Kp = 5 \mu g L^{-1}$). Parametrii urmăriți includ: (a) lungimea totală (mm), (b) distanța interoculară (mm), (c) diametrul lentilei oculare (mm). Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD ($n = 10$ animale pe grup) și au fost analizate utilizând ANOVA unidirecțională, urmată de testul Tukey. Literele comune indică grupurile care nu diferă semnificativ statistic între ele.

3.2.3. Expunerea adulților (6 luni) de *Danio rerio*

➤ Testul acvariului nou

Peștii zebură expuși la VPA și $Mp + Kp$ au prezentat o creștere considerabilă a distanței parcurse ($p < 0,001$), comparativ cu grupul de control, în timpul celor 5 minute de înregistrare video, realizată cu o cameră plasată în fața acvariului de testare - Fig. III.15.(a). Mai mult, grupul $VPA + Kp$ a prezentat o scădere semnificativă a vitezei medii de înot ($8,17 \pm 1,96 \text{ cm s}^{-1}$), în timp ce grupurile VPA ($14,13 \pm 1,19 \text{ cm s}^{-1}$) și $Mp + Kp$ ($14,53 \pm 1,31 \text{ cm s}^{-1}$) au avut cele mai mari viteze medii, comparativ cu grupul de control ($1,05 \pm 1,21 \text{ cm s}^{-1}$) - Fig. III.15.(b). După cum se observă în Fig. III.15.(c), peștii tratați cu Mp și $VPA + Kp$ timp de 4 zile au prezentat o creștere semnificativă ($p < 0,001$) a timpului de imobilitate, de aproximativ 1,6 ori. Spre deosebire de grupul de control și cel expus la Mp , care au explorat întregul acvariu, peștii expuși la celelalte tratamente farmaceutice, individuale sau combinate, au explorat în principal partea inferioară a bazinului (geotaxie), sugerând un comportament asociat anxietății - Fig. III.15.(d). Deși peștii zebură tratați cu VPA și Kp , atât individual, cât și în amestec cu Mp , au pătruns frecvent în jumătatea superioară, timpul petrecut în partea superioară a acvariului a fost semnificativ redus, în comparație cu grupul de control.

Frecvența tranzițiilor către partea superioară a acvariului a fost semnificativ mai mică ($p < 0,001$) în grupurile $VPA + Kp$ (de 3,7 ori) și $VPA + Mp + Kp$ (de 5,8 ori), în contrast cu grupul de control - Fig. III.15.(e). În plus, expunerea acută la VPA ($p = 0,001$ vs. control) și la Kp individual ($p < 0,001$ vs. control), precum și la amestecul $Kp + Mp$ ($p < 0,001$ vs. control), a evidențiat o creștere semnificativă a rotațiilor în sens antiorar - Fig. III.15.(f).

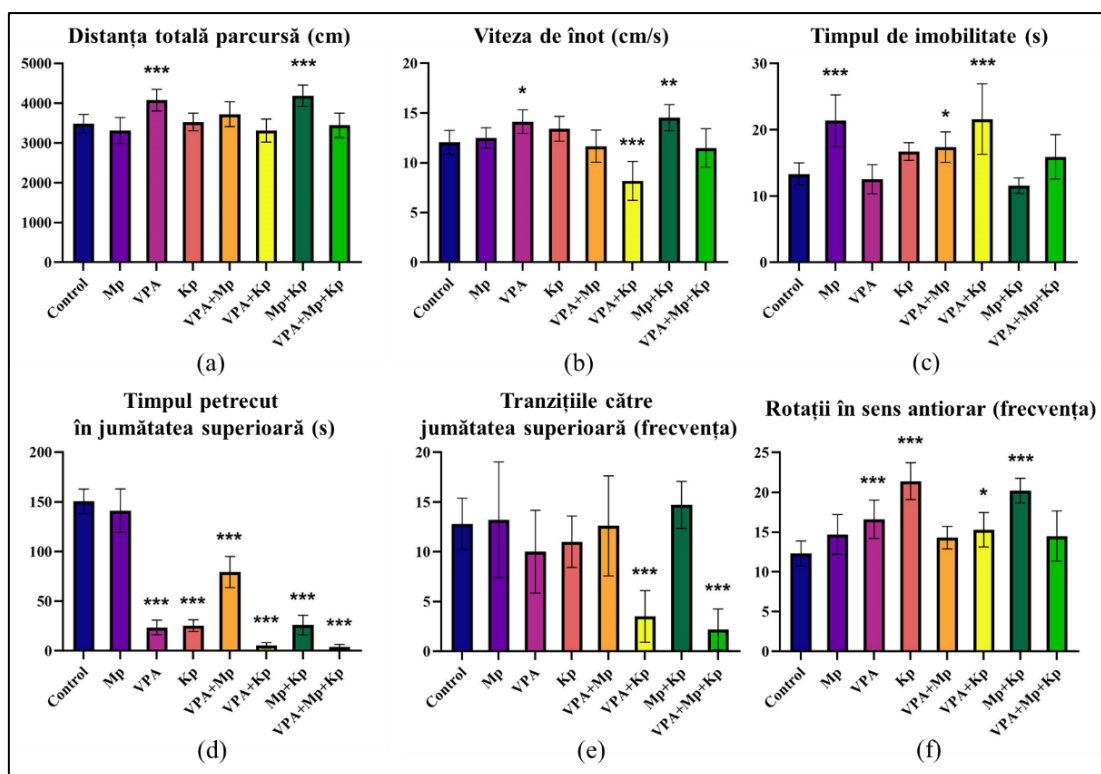


Fig. III.15. Modificări comportamentale la adulții de pește zebură expuși la produse farmaceutice individuale și în amestecuri (Mp = 1 $\mu\text{g L}^{-1}$; VPA = 3 $\mu\text{g L}^{-1}$; Kp = 5 $\mu\text{g L}^{-1}$), timp de 96 h. Parametrii comportamentali măsurați includ: (a) distanța totală parcursă (cm), (b) viteza medie (cm s^{-1}), (c) timpul de imobilitate (s), (d) timpul petrecut în jumătatea superioară (s), (e) tranzițiile către jumătatea superioară și (f) rotațiile în sens antiorar. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD ($n = 10$ animale pe grup, cu un sex ratio 1:1 masculi/femele) și au fost analizate utilizând ANOVA unidirecțională, urmată de testul Dunnett. Diferențele statistice semnificative sunt indicate după cum urmează: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ și *** $p < 0,001$ (Chelaru et al., 2025).

3.2.4. Discuții asupra studiului

Studiul a evaluat efectele valproatului (VPA), ketoprofenului (Kp), meropenemului (Mp) și ale combinațiilor acestora asupra peștelui zebură (*Danio rerio*), integrând răspunsuri comportamentale, biochimice și neurotoxice. Rezultatele au evidențiat modificări importante ale comportamentului locomotor și asociat anxietății. În testul acvariului nou, VPA și combinația Mp+Kp au determinat creșterea activității locomotorii, în timp ce Mp și amestecul ternar (VPA+Mp+Kp) au redus distanța parcursă. Aceste efecte sunt susținute de observațiile din stadiile embrionare și larvare, unde modificările distanței parcurse, timpului activ și preferinței pentru zonele periferice au indicat apariția timpurie a unor perturbări

neurocomportamentale. De asemenea, majoritatea tratamentelor au crescut tigmotaxia și comportamentele asociate anxietății, sugerând afectarea capacității exploratorii și a răspunsului la stres.

La adulți, cele mai evidente efecte au fost observate asupra comportamentului social. Peștii expuși la combinațiile VPA+Kp și VPA+Mp+Kp au prezentat o reducere a preferinței pentru conspecifici, alegând mai frecvent zona lipsită de stimul social, ceea ce indică deficiențe de sociabilitate. Aceste rezultate sunt în concordanță cu modificările observate în studiile privind expunerea la VPA și sugerează că efectele neurocomportamentale pot persista de-a lungul dezvoltării. Totodată, creșterea rotațiilor în sens antiorar și preferința pentru zonele periferice ale acvariului susțin existența unor răspunsuri anxiogene și a unor modificări ale procesării informațiilor la nivel neuronal.

Analizele biochimice au confirmat că expunerea la medicamente și amestecurile acestora induce stres oxidativ și neurotoxicitate. Majoritatea tratamentelor au determinat creșterea nivelului de MDA și modificări ale activității enzimelor antioxidante (SOD și GPx), indicând perturbarea echilibrului oxidativ. În plus, activitatea acetilcolinesterazei (AChE), un marker important al funcției nervoase, a crescut în grupul tratat cu VPA, dar a fost inhibată în unele amestecuri care conțineau VPA, sugerând interacțiuni complexe între compuși și mecanisme neurotoxice diferite. În ansamblu, rezultatele demonstrează că amestecurile farmaceutice pot produce efecte comportamentale și biochimice care diferă de cele generate de substanțele individuale, subliniind necesitatea evaluării contaminanților în condiții de expunere mixtă, mai apropiate de cele întâlnite în mediul natural.

3.3. Studiul experimental nr. 3: Efectele individuale și combinate ale ketoprofenului și micro-nanoplasticelor de polipropilenă asupra dezvoltării și comportamentului peștilor zebură

Scopul studiului a fost evaluarea efectelor individuale și combinate ale ketoprofenului (Kp) și particulelor de polipropilenă (PP) asupra peștelui zebură (*Danio rerio*) în stadiile embrionar, larvar și adult. La embrioni și larve au fost analizați parametrii de dezvoltare și toxicitate, incluzând mortalitatea, malformațiile, rata de eclozare, frecvența cardiacă, parametrii morfometrici și comportamentul locomotor în condiții de lumină și întuneric. La adulți, după 96

h de expunere, au fost evaluate comportamentele asociate locomoției, anxietății și interacțiunii sociale prin testul acvariului nou și testul de preferință socială.

3.3.1. Expunerea embrionilor (5 hpf) de *Danio rerio*

➤ Parametrii fiziologici și morfologici măsurați la stadiul embrionar

În urma testului FET (amestecuri de Kp cu PP) realizat pe stadiul embrionar al speciei *Danio rerio* (Fig. III.20.), procentul de mortalitate și anomalii morfologice la expunerea la EC_{20, Mlf} a însumat 50%, iar la EC_{50, Mlf} un total de 60% - Fig. III.20.(a).

Pentru frecvența cardiacă și rata de eclozare nu au fost identificate diferențe semnificative statistic - Fig. III.20.(b), (c).

Pentru distanța interoculară a embrionilor la 120 h de expunere, este de subliniat că ambele niveluri de Kp (distanță interoculară medie de $0,116 \pm 0,004$ mm și $0,123 \pm 0,009$ mm pentru grupurile EC_{20, Mlf} și EC_{50, Mlf}, respectiv) au indus o scădere semnificativă a acestui parametru, comparativ cu organismele din grupul de control (distanță interoculară medie de $0,141 \pm 0,015$ mm) ($p < 0,05$) - Fig. III.20.(d).

Pentru expunerea la amestecuri cu PP, organismele expuse au prezentat o distanță interoculară semnificativ mai mică decât cea a grupului de control ($p < 0,05$) - Fig. III.20.(d), cu excepția grupurilor expuse la EC_{20, Mlf} + 0,1 μg L⁻¹ PP și EC_{50, Mlf} + 10 μg L⁻¹ PP.

Pentru lungimea totală, diferențe semnificative statistic au fost identificate doar pentru grupul expus la EC_{50, Mlf}, unde lungimea totală medie a fost de $4,157 \pm 0,274$ mm, comparativ cu grupul de control, la care lungimea totală medie a fost de $4,392 \pm 0,123$ mm - Fig. III.20.(e).

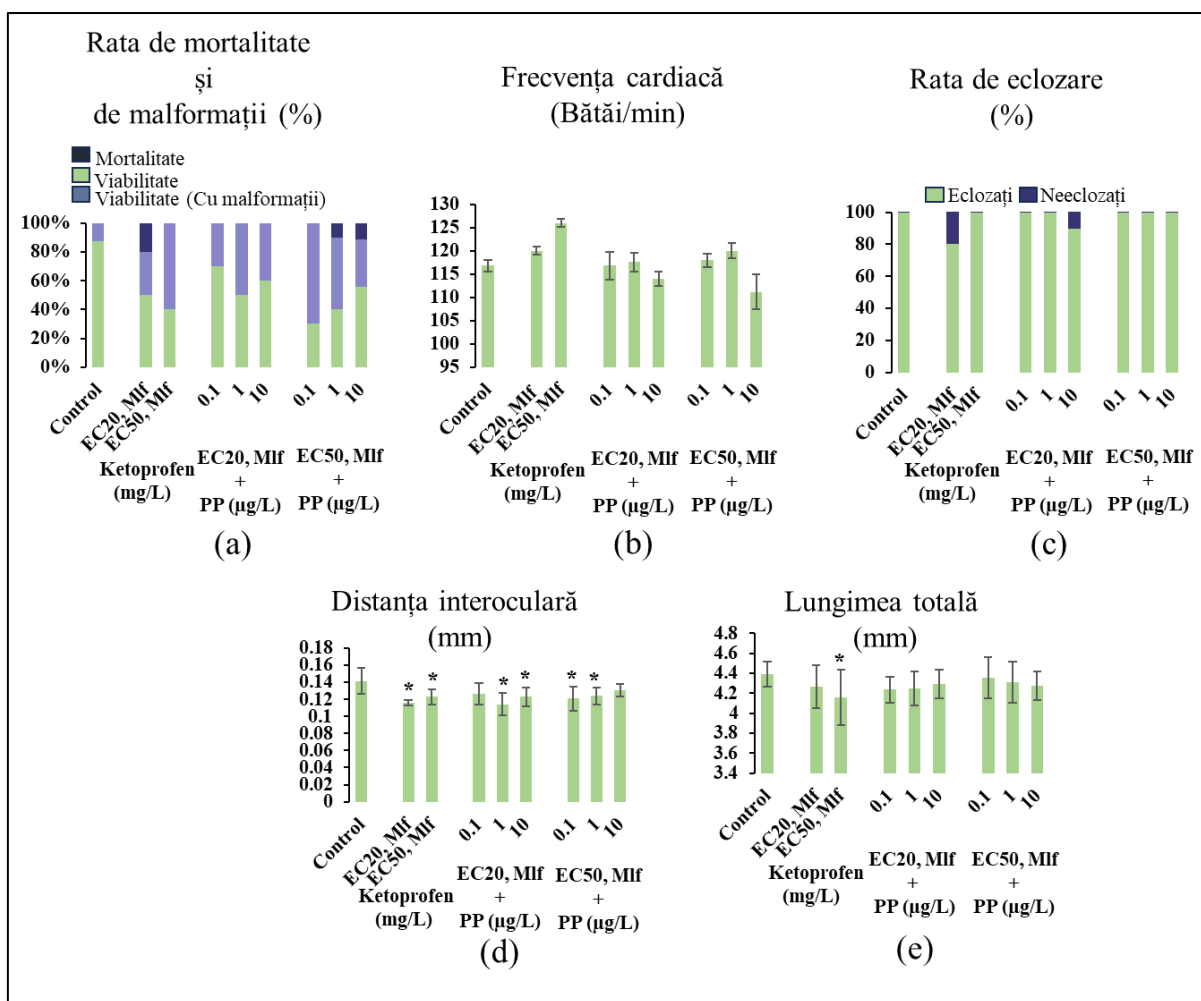


Fig. III.20. Parametrii fiziologici și morfologici măsurați la stadiul embrionar (5 hpf) al speciei *Danio rerio*, expus timp de 120 h la mixturi de ketoprofen (Kp) la concentrațiile care induc 20 și 50% malformații ($EC_{20, Mlf}$ și $EC_{50, Mlf}$, exprimate în $mg\ L^{-1}$) și micro-nanoplastice de polipropilenă (PP) la concentrațiile de 0,1; 1 și $10\ \mu g\ L^{-1}$. Parametrii urmăriți includ: (a) rata de mortalitate și malformațiile (%), (b) frecvența cardiacă (bătăi/min), (c) rata de eclozare (%), (d) distanța interoculară (mm), (e) lungimea totală (mm). Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD ($n = 10$ animale pe grup) și au fost analizate utilizând ANOVA unidirecțională, urmată de testul Dunnett. Diferențele statistic semnificative sunt indicate după cum urmează: * $p < 0,05$.

3.3.2. Expunerea larvelor (72 hpf) de *Danio rerio*

➤ Parametrii fiziologici și morfologici măsurați la stadiul larvar

În ceea ce privește expunerea larvelor la Kp, pentru $EC_{20, Mlf}$ și $EC_{50, Mlf}$, mortalitatea și anomaliile morfologice au însumat împreună 50% efect în ambele cazuri, în timp ce până la

40% au fost observate pentru grupurile tratate $LC_{20, Mlf} + 1$ și $10 \mu g L^{-1}$ PP, precum și până la 40% pentru grupurile tratate cu $EC_{50, Mlf} + 1 \mu g L^{-1}$ PP - Fig. III.24.(a).

Nu au fost identificate diferențe semnificative statistic pentru cele două repere biometrice, respectiv distanța interoculară și lungimea totală ($p > 0,05$) - Fig. III.24.(b), (c).

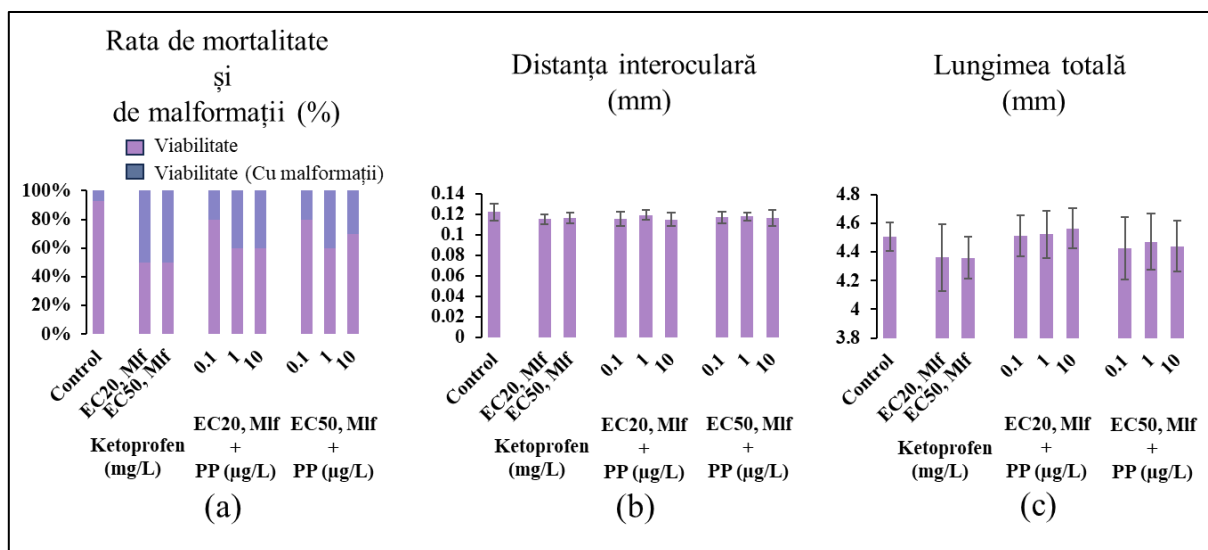


Fig. III.24. Parametrii fiziologici și morfologici măsurați la stadiul larvar (72 hpf) al speciei *Danio rerio*, expus timp de 120 h la ketoprofen (Kp) și micro-nanoplastice de polipropilenă (PP) la concentrațiile de 0,1; 1 și $10 \mu g L^{-1}$. Parametrii urmăriți includ: (a) rata de mortalitate și malformațiile, (b) distanța interoculară, (c) lungimea totală. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD ($n = 10$ animale pe grup) și au fost analizate utilizând ANOVA unidirecțională, urmată de testul Dunnett.

3.3.3. Expunerea adulților (8 luni) de *Danio rerio*

➤ Testul acvariului nou

Rezultatele testului acvariului nou, în urma expunerii de 96 h la Kp, PP și amestecul dintre acestea, nu au arătat diferențe relevante statistic cu privire la distanța totală parcursă ($p > 0,05$) - Fig. III.28.(a). În ceea ce privește timpul de imobilitate, s-a observat o creștere semnificativă la grupul tratat cu Kp+PP, față de grupul de control ($p < 0,001$) - Fig. III.28.(b). Diferențe relevante statistic au fost semnalate în cazul timpului petrecut în jumătatea superioară a acvariului, unde grupul de control a explorat semnificativ mai mult decât grupul tratat cu PP ($p < 0,001$), Kp+PP ($p = 0,02$) și fără semnificație statistică față de grupul tratat cu Kp ($p = 0,061$) - Fig. III.28.(c). De asemenea, un alt parametru de interes a fost timpul petrecut în zona

inferioară a acvariului, unde grupul de control a petrecut semnificativ mai puțin timp, comparativ cu Kp ($p = 0,020$), PP ($p < 0,001$) și Kp+PP ($p < 0,001$) - Fig. III.28.(d).

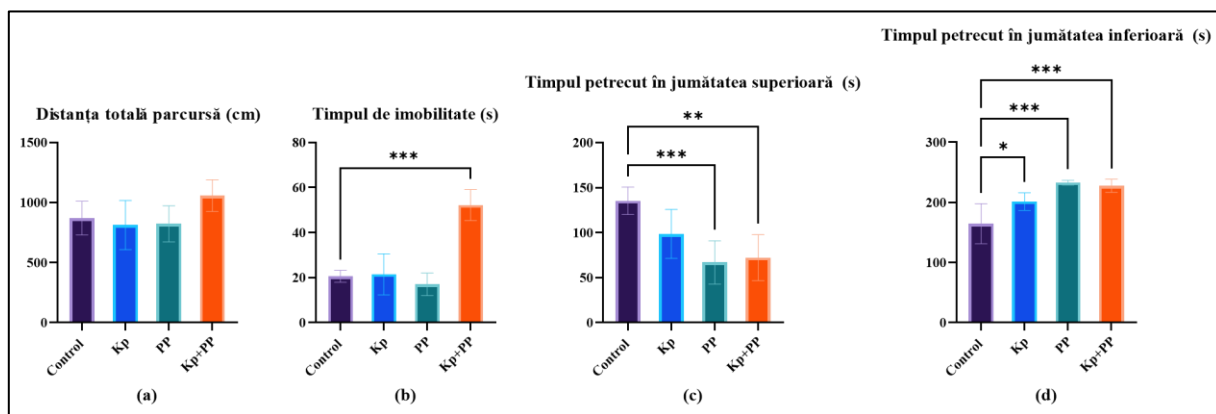


Fig. III.28. Efectele expunerii la ketoprofen (Kp) și polipropilenă (PP), individual și în amestec (Kp = 5 $\mu\text{g L}^{-1}$; PP = 2 mg L^{-1}) asupra locomoției adulților de pește zebură. Parametrii comportamentali măsurați includ: (a) distanța totală parcursă (cm), (b) timpul de imobilitate (s), (c) timpul petrecut în jumătatea superioară (s) și (d) timpul petrecut în jumătatea inferioară (s) a acvariului. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD ($n = 10$ animale pe grup, cu un sex ratio 1:1 masculi/femele) și au fost analizate utilizând ANOVA unidirecțională, urmată de testul Dunnett. Diferențele statistic semnificative sunt indicate după cum urmează: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ și *** $p < 0,001$.

3.3.4. Discuții asupra studiului

Studiul a demonstrat că expunerea la ketoprofen (Kp), polipropilenă (PP) și amestecurile acestora produce la *Danio rerio* efecte dependente de stadiul de dezvoltare, cele mai pronunțate fiind observate în fazele embrionară și larvară. Kp a indus o creștere dependentă de doză a malformațiilor, iar amestecurile cu PP au accentuat efectele toxice, inclusiv întârzieri ale eclozării, mortalitate crescută și modificări ale unor parametri morfologici, precum distanța interoculară. Deși frecvența cardiacă și lungimea totală nu au fost afectate semnificativ, rezultatele indică o sensibilitate ridicată a stadiilor timpurii la expunerea simultană la contaminanți farmaceutici și micro-nanoplastice.

La nivel comportamental, amestecurile Kp+PP au generat efecte mai severe decât expunerile individuale, atât la embrioni și larve, cât și la adulți. În stadiile timpurii au fost observate modificări semnificative ale activității locomotorii, distanței parcurse, vitezei de deplasare, imobilității și preferinței pentru marginile godeurilor, sugerând răspunsuri de evitare și stres. La adulți, aceeași tendință s-a manifestat prin creșterea timpului de imobilitate,

reducerea explorării zonei superioare a acvariului și preferința pentru zona inferioară, comportamente caracteristice anxietății. Expunerea la Kp și PP a determinat, de asemenea, creșterea rotațiilor în sens orar, indicând posibile alterări ale procesării senzoriale și ale controlului motor.

Rezultatele obținute sugerează că efectele induse în stadiile timpurii pot persista și influența comportamentul adulților. Peștii expuși la Kp, PP și amestecul Kp+PP au prezentat o reducere a preferinței sociale și o tendință de evitare a conspecificilor, indicând afectarea interacțiunilor sociale. În ansamblu, studiul evidențiază că asocierea dintre ketoprofen și micro/nanoplastice amplifică efectele toxice și comportamentale, comparativ cu expunerile individuale, subliniind vulnerabilitatea crescută a embrionilor și larvelor și importanța evaluării efectelor combinate ale contaminanților emergenți pe întregul parcurs al dezvoltării.

3.4. Studiul experimental nr. 4: Efectele individuale și combinate ale ketoprofenului și micro-nanoplasticelor de acid polilactic asupra dezvoltării și comportamentului peștilor zebă

Studiul a investigat efectele combinate ale ketoprofenului (Kp) și micro-nanoplasticelor de PLA asupra peștelui zebă (*Danio rerio*) în stadiile embrionar, larvar și adult. Pentru embrioni și larve au fost evaluate mortalitatea, malformațiile, dezvoltarea morfologică și comportamentul locomotor, iar pentru adulți au fost analizate comportamentele exploratorii, anxioase și sociale, după o expunere de 96 h. Parametrii comportamentali monitorizați au inclus activitatea locomotorie, imobilitatea, viteza de înot, rotațiile și preferința pentru anumite zone ale mediului de testare.

3.4.1. Expunerea embrionilor (5 hpf) de *Danio rerio*

➤ Parametrii fiziologici și morfologici măsurați la stadiul embrionar

În testul FET, realizat la stadiul embrionar de *Danio rerio* (Fig. III.33.), rata mortalității și cea a malformațiilor au fost analizate împreună, fiind considerate drept efect total.

Acestea au reprezentat aproximativ 50% din răspuns la concentrația $EC_{20, Mlf}$ și au ajuns până la 80% în cazul expunerii la $EC_{50, Mlf}$ - Fig. III.33.(a).

Pentru expunerile la amestecuri cu EC_{20, Mlf} și PLA, efectele observate au fost aproximativ similare celor înregistrate la expunerile individuale. La concentrația mai ridicată de EC_{50, Mlf} împreună cu PLA, impactul a fost și mai pronunțat, cu valori minime de 70% și maxime care au atins 80%, în timp ce în grupul de control nu s-au observat efecte - Fig. III.33.(a).

De asemenea, frecvența cardiacă a fost semnificativ statistic mai redusă pentru grupurile expuse la EC_{50, Mlf} și la EC_{50, Mlf} + 10 μg L⁻¹ PLA, în comparație cu grupul de control - Fig. III.33.(b).

Eclozarea embrionilor a fost întârziată cu 10% la EC_{20, Mlf} și până la 40% la EC_{50, Mlf}, comparativ cu grupul de control - Fig. III.33.(c). Grupurile expuse la amestecul de EC_{20, Mlf} + 1 μg L⁻¹ PLA a prezentat o rată de eclozare de doar 50%, pe când amestecul de EC_{20, Mlf} + 10 μg L⁻¹ PLA a prezentat o rată de eclozare de 40%. Amestecurile cu EC_{50, Mlf} și 0,1; 1, respectiv 10 μg L⁻¹ PLA au prezentat o rată a eclozării de 100% - Fig. III.33.(c).

La finalul perioadei de expunere, ambele niveluri de Kp au indus o scădere semnificativă a distanței interoculare, cu valori medii de $0,127 \pm 0,009$ mm și $0,128 \pm 0,007$ mm pentru grupurile expuse la EC_{20, Mlf}, respectiv EC_{50, Mlf}, comparativ cu organismele din grupul de control ($0,145 \pm 0,009$ mm) ($p < 0,05$) - Fig. III.33.(d).

De asemenea, expunerea la amestecuri de PLA și Kp a determinat valori ale distanței interoculare semnificativ mai mici decât cele înregistrate în grupul de control ($p < 0,05$) - Fig. III.33.(d), valorile corespunzătoare EC_{50, Mlf} + PLA fiind, în general, mai mici decât cele observate pentru EC_{20, Mlf} + PLA.

Pentru lungimea totală, diferențe semnificative statistic au fost obținute doar pentru grupurile expuse la EC_{50, Mlf}, unde lungimea totală medie a fost de $4,238 \pm 0,153$ mm, comparativ cu grupul de control, la care lungimea totală medie a fost de $4,375 \pm 0,205$ mm - Fig. III.33.(e).

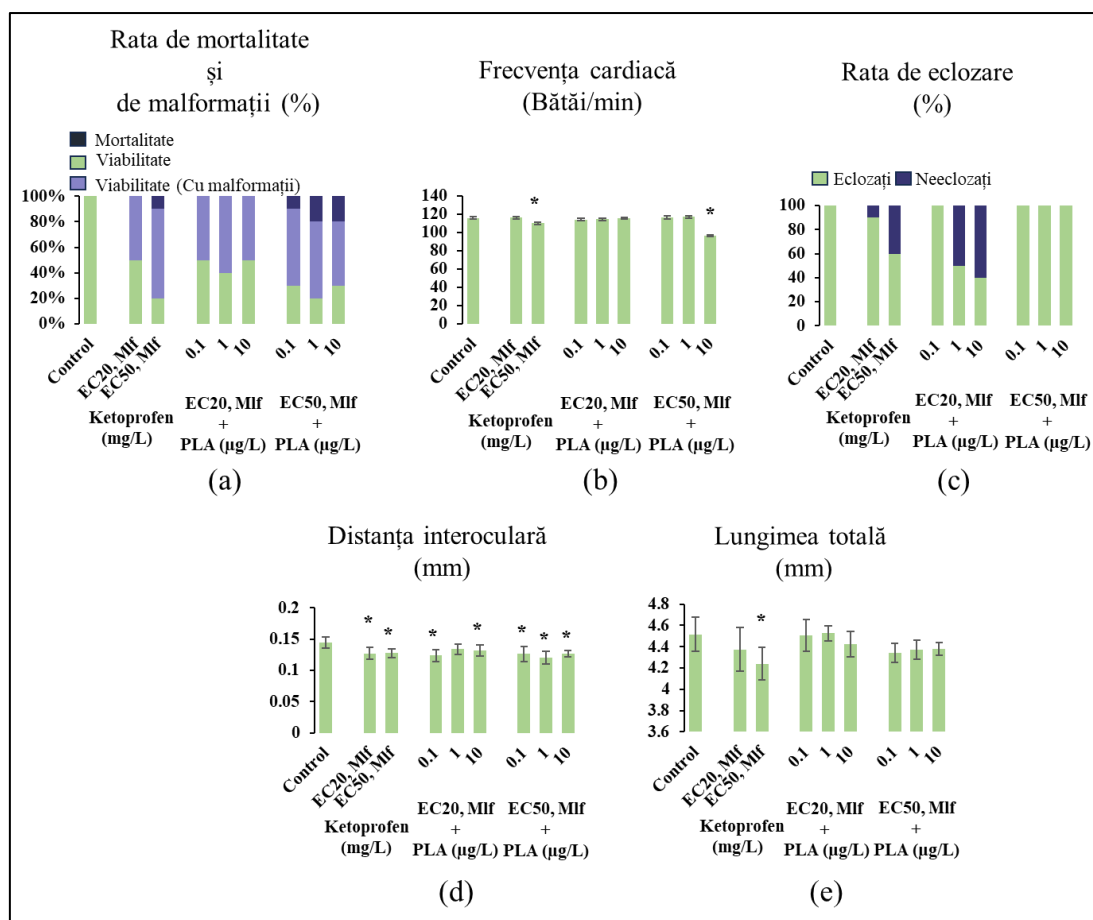


Fig. III.33. Parametrii fiziologici și morfologici măsurați la stadiul embrionar (5 hpf) de *Danio rerio*, expus la mixturi de ketoprofen (Kp) la concentrațiile care induc 20 și 50% malformații (EC₂₀, Mlf și EC₅₀, Mlf, exprimate în mg L⁻¹) și micro-nanoplastice de acid polilactic (PLA) la concentrațiile de 0,1; 1; 10 μg L⁻¹. Parametrii urmăriți includ: (a) rata de mortalitate și malformațiile (%), (b) frecvența cardiacă (bătăi/min), (c) rata de eclozare (%), (d) distanța interoculară (mm), (e) lungimea totală (mm). Datele sunt prezentate ca medie ± SD (n = 10 animale pe grup) și au fost analizate utilizând ANOVA unidirecțională, urmată de testul Dunnett. Diferențele statistic semnificative sunt indicate după cum urmează: * $p < 0,05$.

3.4.2. Expunerea larvelor (72 hpf) de *Danio rerio*

➤ Parametrii fiziologici și morfologici măsurați la stadiul larvar

Pentru larvele expuse la concentrații individuale de Kp, mortalitatea și malformațiile au reprezentat împreună aproximativ 30% pentru grupul expus la EC₂₀, Mlf și au atins până la 70% pentru cel expus la EC₅₀, Mlf - Fig. III.37.(a).

În legătură cu amestecurile dintre Kp și micro-nanoplasticele de PLA, efectele au fost mai pronunțate. Pentru grupul expus la $EC_{20, Mlf} + PLA$, cel mai redus efect a fost de 20%, în timp ce valoarea maximă a ajuns la 50%. Pentru grupul tratat cu $EC_{50, Mlf} + PLA$, efectul a variat între 70% și 80%, indicând o creștere semnificativă statistic a ratei de mortalitate și a malformațiilor, în comparație cu expunerile individuale - Fig. III.37.(a). Nu au fost observate modificări semnificative statistic pentru distanța interoculară și lungimea totală a larvelor după expunere ($p > 0,05$) - Fig. III.37.(b), (c).

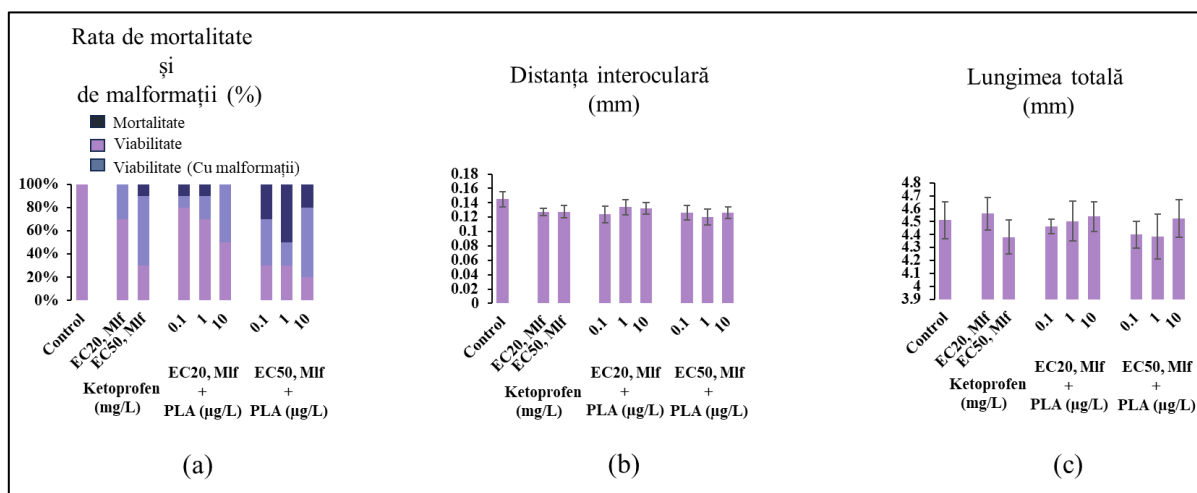


Fig. III.37. Parametrii fiziologici și morfologici măsurați la stadiul larvar (72 hpf) al speciei *Danio rerio*, expus timp de 120 h la ketoprofen (Kp) și micro-nanoplastice de acid polilactic (PLA) la concentrațiile de 0,1; 1 și 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Parametrii urmăriți includ: (a) rata de mortalitate și malformațiile, (b) distanța interoculară, (c) lungimea totală. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD ($n = 10$ animale pe grup) și au fost analizate utilizând ANOVA unidirecțională, urmată de testul Dunnett.

3.4.3. Expunerea adulților (8 luni) de *Danio rerio*

➤ Testul acvariului nou

În ceea ce privește distanța totală parcursă, nu s-au observat diferențe semnificative statistic ($p > 0,05$) - Fig. III.41.(a), dar viteza de înot a fost semnificativ mai scăzută în cazul grupului tratat cu PLA ($p = 0,002$), comparativ cu grupul de control - Fig. III.41.(b).

Nu s-au observat diferențe semnificative statistic pentru grupurile expuse, față de cel de control pentru timpul de activitate total ($p > 0,05$) - Fig. III.41.(c).

În ceea ce privește timpul de imobilitate, s-a observat o creștere semnificativă între toate grupurile tratate ($p < 0,001$), comparativ cu grupul de control - Fig. III.41.(d).

Pentru a compara comportamentul explorator al peștilor din grupul de control cu grupurile tratate s-a împărțit acvariul în două jumătăți și s-a măsurat timpul petrecut în fiecare jumătate. În jumătatea inferioară nu s-au observat diferențe semnificative statistic între grupurile tratate și grupul de control ($p > 0,05$) - Fig. III.41.(f).

S-a observat o scădere semnificativă statistic a timpului petrecut în jumătatea superioară de grupul tratat cu Kp+PLA ($p = 0,027$), comparativ cu grupul de control - Fig. III.41.(e). Nu s-au observat diferențe semnificative statistic între celelalte grupuri tratate și grupul de control ($p > 0,05$).

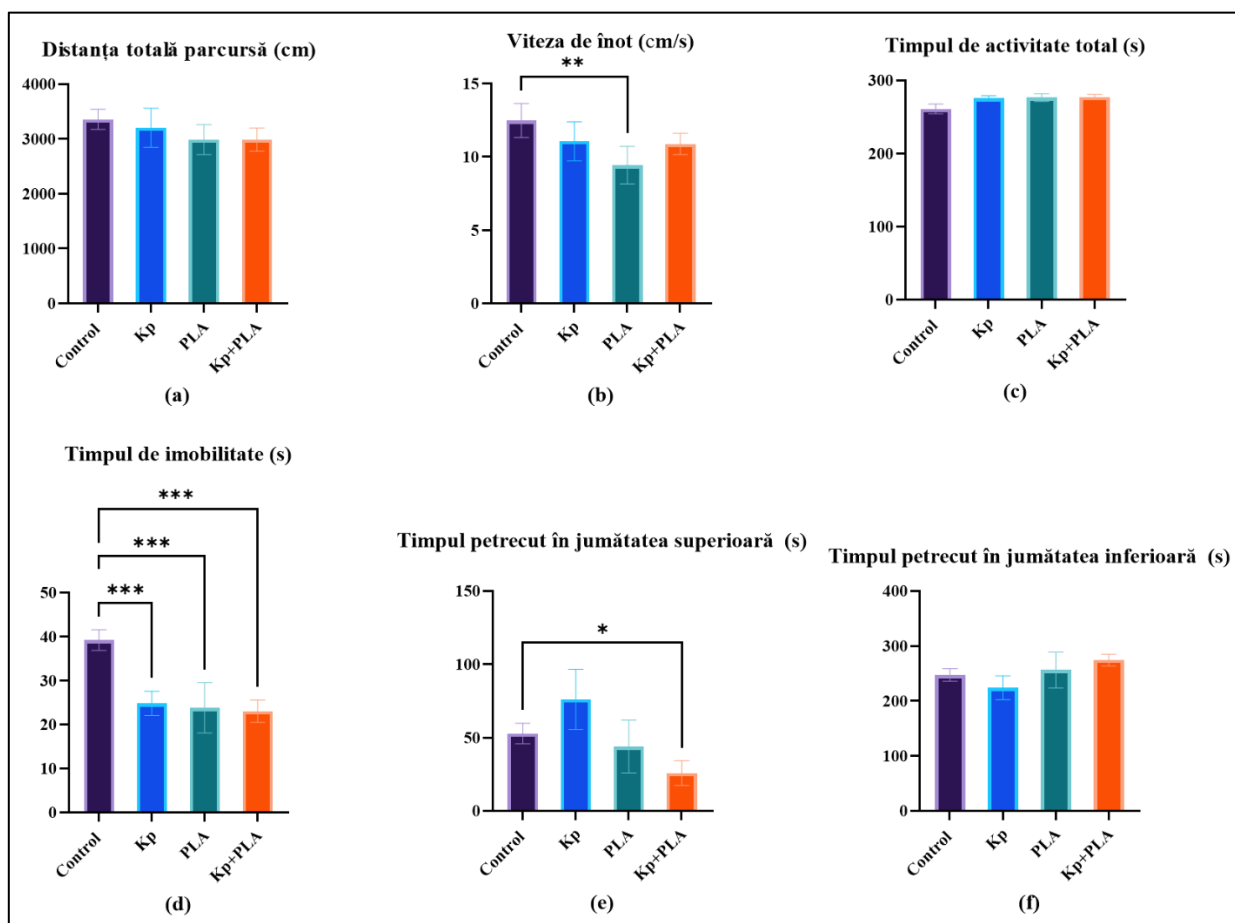


Fig. III.41. Efectele expunerii la ketoprofen (Kp) și acid polilactic (PLA), individual și în amestec (Kp = 10 $\mu\text{g L}^{-1}$; PLA = 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) timp de 96 h. Parametrii comportamentali măsurați includ: (a) distanța totală parcursă (cm), (b) viteza de înot (cm/s), (c) timpul de activitate total (s), (d) timpul de imobilitate (s), (e) timpul petrecut în jumătatea superioară (s) și (f) timpul petrecut în jumătatea inferioară (s). Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD ($n = 10$ animale pe grup, cu un sex ratio 1:1 masculi/femele) și au fost analizate utilizând ANOVA unidirecțională, urmată de testul Dunnett. Diferențele statistic semnificative sunt indicate după cum urmează: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ și *** $p < 0,001$.

3.4.4. Discuții asupra studiului

Studiul a evidențiat că micro-nanoplasticele (MNPL) de PLA administrate individual nu au produs efecte semnificative asupra mortalității sau frecvenței malformațiilor, comparativ cu grupul de control. În schimb, asocierea acestora cu ketoprofenul (Kp) a determinat modificări comportamentale evidente la toate stadiile de dezvoltare investigate. Atât embrionii, cât și larvele expuse la amestecul Kp+PLA au prezentat o creștere accentuată a rotațiilor în sens orar și antiorar, în special în condiții de întuneric, sugerând alterarea tiparelor normale de mișcare și apariția unor răspunsuri asociate stresului încă din etapele timpurii ale dezvoltării.

Aceste efecte s-au menținut și la stadiul adult, unde expunerea la amestecul Kp+PLA a determinat o creștere semnificativă a rotațiilor în sens antiorar, comportament recunoscut ca indicator al stresului, anxietății și disfuncțiilor neurologice la *Danio rerio*. Concordanța dintre răspunsurile observate la embrioni, larve și adulți sugerează că expunerea la amestec poate induce perturbări neurocomportamentale persistente pe parcursul ontogenezei, evidențiind un potențial efect de amplificare a toxicității prin interacțiunea dintre contaminantul farmaceutic și particulele plastice.

Un rezultat important al studiului este faptul că PLA, deși este considerat un material biodegradabil și o alternativă ecologică la plasticele convenționale, nu s-a dovedit lipsit de efecte biologice. Expunerea embrionilor și larvelor la MNPL de PLA, în special în combinație cu Kp, a generat efecte subletale și letale mai pronunțate decât cele raportate anterior pentru unele plastice convenționale. Aceste rezultate subliniază necesitatea reevaluării impactului ecotoxicologic al bioplasticelor și demonstrează că statutul de material „ecologic” nu garantează absența riscurilor pentru organismele acvatice, în special în stadiile timpurii de dezvoltare.

CONCLUZII

Această lucrare demonstrează faptul că impactul ecotoxicologic al contaminanților emergenți din mediul acvatic este condiționat de interacțiunile dintre substanțe, atât în cazul amestecurilor de compuși farmaceutici, cât și al combinațiilor dintre aceștia și micro-nanoplastice (MNPL). Analiza rezultatelor obținute pe modelul experimental *Danio rerio* indică faptul că răspunsurile biologice diferă în funcție de stadiul de dezvoltare și de tipul expunerii, neputând fi anticipate pe baza efectelor individuale ale substanțelor. Astfel, expunerea la amestecuri determină efecte toxice semnificativ diferite față de expunerea la contaminați individuali.

În concluzie, rezultatele acestei lucrări susțin necesitatea unor abordări moderne și integrate în evaluarea riscurilor ecotoxicologice. Integrarea parametrilor comportamentali și neurofuncționali oferă o perspectivă mai sensibilă și mai realistă asupra efectelor contaminanților emergenți. Totodată, datele obținute demonstrează că materialele plastice biodegradabile nu pot fi considerate automat sigure și că interacțiunea dintre poluanții chimici și MNPL poate genera efecte biologice cu potențial impact asupra supraviețuirii și funcționării organismelor acvatice.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Abdollahi, S., Raissi, H., & Farzad, F. (2025). The role of microplastics as vectors of antibiotic contaminants via a molecular simulation approach. *Scientific Reports*, 15(1), 27007. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-12799-6>.
2. Ács, A., Liang, X., Bock, I., Griffiths, J., Ivánovics, B., Vásárhelyi, E., Ferincz, Á., Pirger, Z., Urbányi, B., & Csenki, Z. (2022). Chronic Effects of Carbamazepine, Progesterone and Their Mixtures at Environmentally Relevant Concentrations on Biochemical Markers of Zebrafish (*Danio rerio*). *Antioxidants*, 11(9), 1776. <https://doi.org/10.3390/antiox11091776>.
3. Alkimin, G. D., Soares, A. M. V. M., Barata, C., & Nunes, B. (2020). Evaluation of ketoprofen toxicity in two freshwater species: Effects on biochemical, physiological and population endpoints. *Environmental Pollution*, 265(Pt B), 114993. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114993>.
4. Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596–1605. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>.
5. Atugoda, T., Vithanage, M., Wijesekara, H., Bolan, N., Sarmah, A. K., Bank, M. S., You, S., & Ok, Y. S. (2021). Interactions between microplastics, pharmaceuticals and personal care products: Implications for vector transport. *Environment International*, 149, 106367. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106367>.
6. Barreto, M., Lopes, I., & Oliveira, M. (2023). Micro(nano)plastics: A review on their interactions with pharmaceuticals and pesticides. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 169, 117307. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117307>.
7. Cardoso-Vera, J. D., Elizalde-Velázquez, G. A., Islas-Flores, H., Mejía-García, A., Ortega-Olvera, J. M., & Gómez-Oliván, L. M. (2021). A review of antiepileptic drugs: Part 1 occurrence, fate in aquatic environments and removal during different treatment technologies. *Science of The Total Environment*, 768, 145487. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145487>.
8. Chelaru, I.-A., Ciausiu, R.-A., Savuca, A., Ureche, C., Nicoara, M. N., Ciobica, A. S., Andronic, G.-A., Ambrosie, R.-M., & Ureche, D. (2025). Effects of environmentally relevant ibuprofen and valproic acid exposure on zebrafish behavior. *Biomolecules and Biomedicine*. <https://doi.org/10.17305/bb.2026.14030>.
9. Chelaru, I.-A., Strungaru-Jijie, R., Nicoara, M., Mirila, D., Ciobica, A., & Ureche, D. (2025). Single and Combined Effects of Meropenem, Valproic Acid, and Ketoprofen on Adult Zebrafish Behavior, Oxidative Stress, and Acetylcholinesterase Activity. *Pharmaceuticals*, 18(8), 1096. <https://doi.org/10.3390/ph18081096>.
10. Coimbra, R. N., Escapa, C., & Otero, M. (2021). Removal of Pharmaceuticals from Water: Conventional and Alternative Treatments. *Water*, 13(4), 487. <https://doi.org/10.3390/w13040487>.

11. Desai, M., Njoku, A., & Nimo-Sefah, L. (2022). Comparing Environmental Policies to Reduce Pharmaceutical Pollution and Address Disparities. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(14), 8292. <https://doi.org/10.3390/ijerph19148292>.
12. Diniz, M. S., Salgado, R., Pereira, V. J., Carvalho, G., Oehmen, A., Reis, M. a. M., & Noronha, J. P. (2015). Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol and their photolysis byproducts in zebrafish (*Danio rerio*). *The Science of the Total Environment*, 505, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.103>.
13. Gomes, S. da S., da Silva, J. F., Padilha, R. M. O., de Vasconcelos, J. V. A., Negreiros Neto, L. G. de, Marrs, J. A., & Cadena, P. G. (2024). Behavioral Effects of the Mixture and the Single Compounds Carbendazim, Fipronil, and Sulfentrazone on Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. *Biomedicines*, 12(6), 1176. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12061176>.
14. Hildebrandt, L., Nack, F. L., Zimmermann, T., & Pröfrock, D. (2021). Microplastics as a Trojan horse for trace metals. *Journal of Hazardous Materials Letters*, 2, 100035. <https://doi.org/10.1016/j.hazl.2021.100035>.
15. Hong, X., Zhao, G., Zhou, Y., Chen, R., Li, J., & Zha, J. (2021). Risks to aquatic environments posed by 14 pharmaceuticals as illustrated by their effects on zebrafish behaviour. *The Science of the Total Environment*, 771, 145450. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145450>.
16. Hossain, Md. T., Shahid, Md. A., Mahmud, N., Habib, A., Rana, Md. M., Khan, S. A., & Hossain, Md. D. (2024). Research and application of polypropylene: A review. *Discover Nano*, 19(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s11671-023-03952-z>.
17. Jijie, R., Paduraru, E., Simionov, I.-A., Faggio, C., Ciobica, A., & Nicoara, M. (2023). Effects of Single and Combined Ciprofloxacin and Lead Treatments on Zebrafish Behavior, Oxidative Stress, and Elements Content. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5). <https://doi.org/10.3390/ijms24054952>.
18. Jijie, R., Solcan, G., Nicoara, M., Micu, D., & Strungaru, S.-A. (2020). Antagonistic effects in zebrafish (*Danio rerio*) behavior and oxidative stress induced by toxic metals and deltamethrin acute exposure. *The Science of the Total Environment*, 698, 134299. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134299>.
19. Karali, N., Khanna, N., & Shah, N. (n.d.). *Climate Impact of Primary Plastic Production*.
20. Kataria, N., Yadav, S., Garg, V. K., Rene, E. R., Jiang, J.-J., Rose, P. K., Kumar, M., & Khoo, K. S. (2024). Occurrence, transport, and toxicity of microplastics in tropical food chains: Perspectives view and way forward. *Environmental Geochemistry and Health*, 46(3), 98. <https://doi.org/10.1007/s10653-024-01862-2>.
21. Klavins, M., Klavins, L., Stabnikova, O., Stabnikov, V., Marynin, A., Ansone-Bertina, L., Mezulis, M., & Vaseashta, A. (2022). Interaction between Microplastics and Pharmaceuticals Depending on the Composition of Aquatic Environment. *Microplastics*, 1(3), 520–535. <https://doi.org/10.3390/microplastics1030037>.

22. Maddah, H. (2016). *Polypropylene as a Promising Plastic: A Review*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Polypropylene-as-a-Promising-Plastic%3A-A-Review-Maddah/682060d2941b3eb5421aab0ac49a28ead79ece58>.
23. Madesh, S., Sudhakaran, G., Meenatchi, R., Manikandan, K., Dhayanithi, N. B., Almutairi, M. H., Almutairi, B. O., Guru, A., & Arockiaraj, J. (2024)a. Neurobehavioral and bioaccumulative toxicity in adult in-vivo zebrafish model due to prolonged cadmium exposure in the presence of ketoprofen. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 38(11), e70005. <https://doi.org/10.1002/jbt.70005>.
24. Madesh, S., Sudhakaran, G., Murugan, R., Almutairi, M. H., Almutairi, B. O., Kathiravan, M. K., & Arockiaraj, J. (2024b). Parental (F0) exposure to Cadmium and Ketoprofen induces developmental deformities in offspring (F1): A transgenerational toxicity assessment in zebrafish model. *The Science of the Total Environment*, 950, 175319. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175319>.
25. Matjašič, T., Mori, N., Hostnik, I., Bajt, O., & Kovač Viršek, M. (2023). Microplastic pollution in small rivers along rural-urban gradients: Variations across catchments and between water column and sediments. *The Science of the Total Environment*, 858(Pt 3), 160043. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160043>.
26. Moermond, C. T. A., Puhlmann, N., Brown, A. R., Owen, S. F., Ryan, J., Snape, J., Venhuis, B. J., & Kümmerer, K. (2022). GREENER Pharmaceuticals for More Sustainable Healthcare. *Environmental Science & Technology Letters*, 9(9), 699–705. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.2c00446>.
27. Muambo, K. E., Kim, M.-G., Kim, D.-H., Park, S., & Oh, J.-E. (2024). Pharmaceuticals in raw and treated water from drinking water treatment plants nationwide: Insights into their sources and exposure risk assessment. *Water Research X*, 24, 100256. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2024.100256>.
28. Nanthini Devi, K., Raju, P., Santhanam, P., Dinesh Kumar, S., Krishnaveni, N., Roopavathy, J., & Perumal, P. (2021). Biodegradation of low-density polyethylene and polypropylene by microbes isolated from Vaigai River, Madurai, India. *Archives of Microbiology*, 203(10), 6253–6265. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02592-0>.
29. Narwal, N., Kakakhel, M., Katyal, D., Yadav, S., Rose, P., Rene, E., Rakib, M. R., Khoo, K. S., & Kataria, N. (2024). Interactions Between Microplastic and Heavy Metals in the Aquatic Environment: Implications for Toxicity and Mitigation Strategies. *Water, Air, & Soil Pollution*, 235. <https://doi.org/10.1007/s11270-024-07343-7>.
30. Onesios-Barry, K. M., Berry, D., Proescher, J. B., Sivakumar, I. K. A., & Bouwer, E. J. (2014). Removal of pharmaceuticals and personal care products during water recycling: Microbial community structure and effects of substrate concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2440–2450. <https://doi.org/10.1128/AEM.03693-13>.
31. Ortúzar, M., Esterhuizen, M., Olicón-Hernández, D. R., González-López, J., & Aranda, E. (2022). Pharmaceutical Pollution in Aquatic Environments: A Concise Review of

- Environmental Impacts and Bioremediation Systems. *Frontiers in Microbiology*, 13, 869332. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.869332>.
32. Paduraru, E., Jijie, R., Simionov, I.-A., Gavrilesescu, C.-M., Ilie, T., Iacob, D., Lupitu, A., Moisa, C., Muresan, C., Copolovici, L., Copolovici, D. M., Mihalache, G., Lipsa, F. D., Solcan, G., Danelet, G.-A., Nicoara, M., Ciobica, A., & Solcan, C. (2024). Honey Enriched with Additives Alleviates Behavioral, Oxidative Stress, and Brain Alterations Induced by Heavy Metals and Imidacloprid in Zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(21). <https://doi.org/10.3390/ijms252111730>.
 33. SanJuan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L., Islas-Flores, H., Martínez, M., García Medina, S., Dublán-García, O., & Hernández-Navarro, M. (2017). Occurrence of Pharmaceuticals in the Environment. In *Handbook of Environmental Chemistry*. https://doi.org/10.1007/698_2017_142.
 34. Savuca, A., Chelaru, I.-A., Balmus, I.-M., Curpan, A.-S., Nicoara, M. N., & Ciobica, A. S. (2024). Toxicological Response of Zebrafish Exposed to Cocktails of Polymeric Materials and Valproic Acid. *Sustainability*, 16(5), 1–14.
 35. Sid, S., Mor, R. S., Kishore, A., & Sharanagat, V. S. (2021). Bio-sourced polymers as alternatives to conventional food packaging materials: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 115, 87–104. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.026>.
 36. Song, J., Wang, C., & Li, G. (2024). Defining Primary and Secondary Microplastics: A Connotation Analysis. *ACS ES&T Water*, 4(6), 2330–2332. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.4c00316>.
 37. Szarka, A., Vnuková, L., Keršňáková, Z., Viktoryová, N., & Hrouzková, S. (2024). Contamination with Pharmaceuticals in Aquatic Environment: Focus on Analytical Methodologies. *Applied Sciences*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/app14198645>.
 38. Wang, Y., Wu, S., Chen, J., Zhang, C., Xu, Z., Li, G., Cai, L., Shen, W., & Wang, Q. (2018). Single and joint toxicity assessment of four currently used pesticides to zebrafish (*Danio rerio*) using traditional and molecular endpoints. *Chemosphere*, 192, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.129>.
 39. Wang, Y., Yang, G., Dai, D., Xu, Z., Cai, L., Wang, Q., & Yu, Y. (2017). Individual and mixture effects of five agricultural pesticides on zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Environmental Science and Pollution Research International*, 24(5), 4528–4536. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8205-9>.
 40. Wilkinson, J. L., Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Leung, K. M. Y., Lai, R. W. S., Galbán-Malagón, C., Adell, A. D., Mondon, J., Metian, M., Marchant, R. A., Bouzas-Monroy, A., Cuni-Sanchez, A., Coors, A., Carriquiriborde, P., Rojo, M., Gordon, C., Cara, M., Moermond, M., Duarte, T., ... Teta, C. (2022). Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(8), e2113947119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>.

41. Wöhler, L., Niebaum, G., Krol, M., & Hoekstra, A. Y. (2020). The grey water footprint of human and veterinary pharmaceuticals. *Water Research X*, 7, 100044. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100044>.
42. Yan, G., Bo, P., Chunyu, Z., & Xuequan, Z. (2015). Morphology of Polypropylene in-Reactor Alloys. *Huaxue Jinzhan*, 27(12), 1815–1821.
43. Yang, G., Wang, Y., Li, J., Wang, D., Bao, Z., Wang, Q., & Jin, Y. (2021). Health risks of chlorothalonil, carbendazim, prochloraz, their binary and ternary mixtures on embryonic and larval zebrafish based on metabolomics analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 404(Pt B), 124240. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124240>.
44. Zhang, H., Zhu, C., Zhao, J., Zheng, R., Xing, J., Li, Z., Zhang, Y., & Xu, Q. (2024). The enhanced hepatotoxicity of isobavachalcone in depigmented zebrafish due to calcium signaling dysregulation and lipid metabolism disorder. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 44(6), 919–932. <https://doi.org/10.1002/jat.4593>.
45. Zhang, M., & Xu, L. (2020). Transport of micro- and nanoplastics in the environment: Trojan-Horse effect for organic contaminants. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52, 1–37. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1845531>
46. Zhao, W., Chen, Y., Hu, N., Long, D., & Cao, Y. (2024). The uses of zebrafish (*Danio rerio*) as an in vivo model for toxicological studies: A review based on bibliometrics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 272, 116023. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116023>.