



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας
Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

**Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό του
αντιβιοτικού Σουλφαδοξίνη και των προϊόντων μετασχηματισμού
του, από Προηγμένες Οξειδωτικές Μεθόδους Αντιρρύπανσης.**

Παναγιώτης Μπιζιρτσάκης

Διπλωματική Εργασία

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Δημητρούλα Λαμπροπούλου

Πάτρα, Φεβρουάριος 2024

© Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, 2024

Η παρούσα Εργασία καθώς και τα αποτελέσματα αυτής, αποτελούν συνιδιοκτησία του ΕΑΠ και του φοιτητή, ο καθένας από τους οποίους έχει το δικαίωμα ανεξάρτητης χρήσης, αναπαραγωγής και αναδιανομής τους (στο σύνολο ή τμηματικά) για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, σε κάθε περίπτωση αναφέροντας τον τίτλο και το συγγραφέα της Εργασίας καθώς και το όνομα του ΕΑΠ όπου εκπονήθηκε.

Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό του
αντιβιοτικού Σουλφαδοξίνη και των προϊόντων μετασχηματισμού
του, από Προηγμένες Οξειδωτικές Μεθόδους Αντιρρύπανσης

Παναγιώτης Μπιζιρτσάκης

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

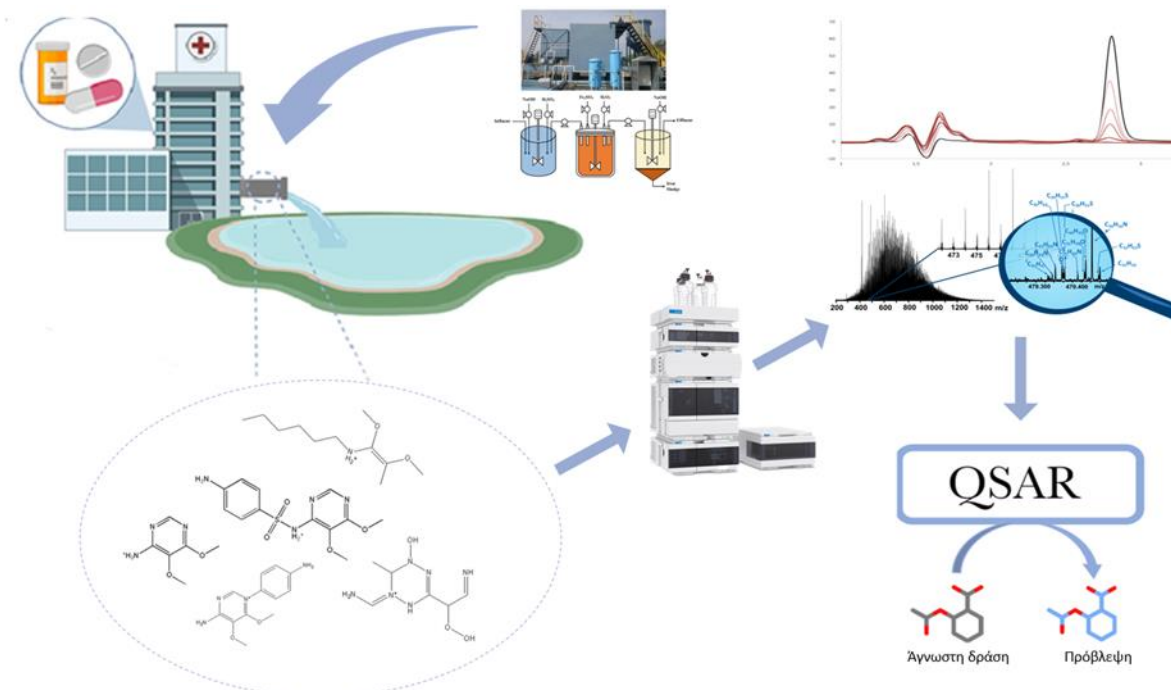
Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:
Δημητρούλα Λαμπροπούλου

Συν-Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:
Αναστασία Ελένη Κορδούλη

Πάτρα, Φεβρουάριος 2024

Στην οικογένειά μου...

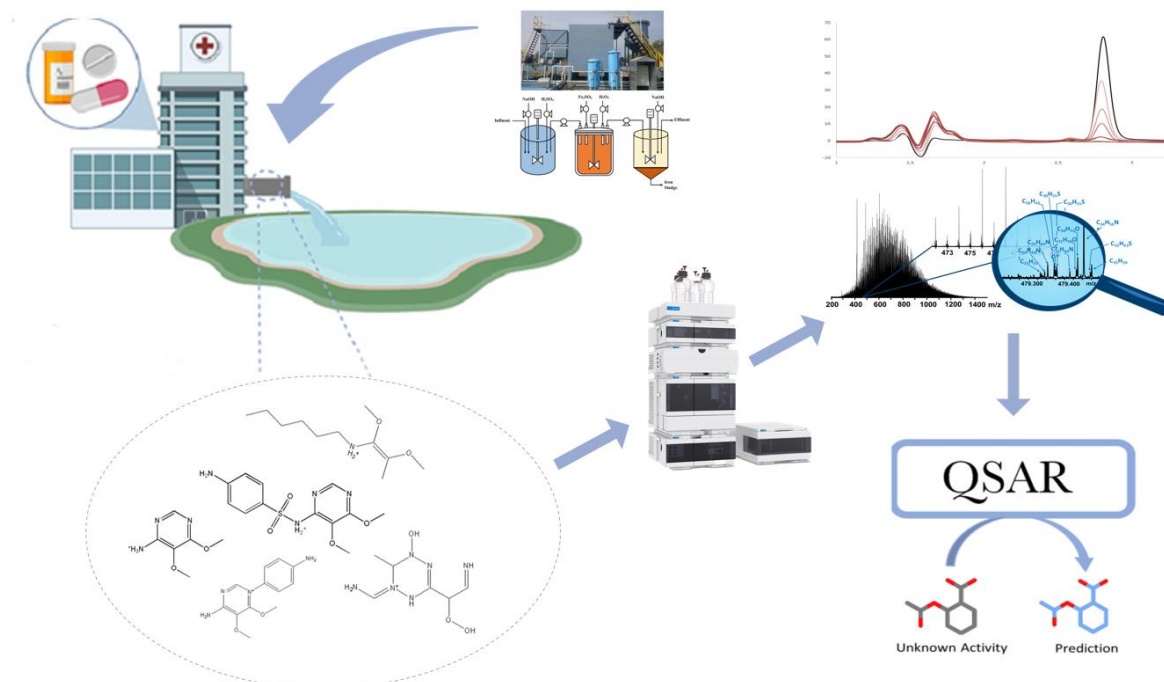
ΠΕΡΙΛΗΨΗ



Στην εργασία αυτή αναπτύχθηκε μία μέθοδος υγρής χρωματογραφίας για την παρακολούθηση του φαρμακευτικού ρύπου Σουλφαδοξίνη και των προϊόντων μετασχηματισμού του, σε υδατικά δείγματα. Η ρύπανση των υδάτων με το συγκεκριμένο αντιβιοτικό ενέχει κινδύνους ανάπτυξης ανοσίας από το σποροζώιτη, που προκαλεί την Ελονοσία. Επειδή τα προϊόντα μετασχηματισμού της Σουλφαδοξίνης δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα σαν αναλυτικά πρότυπα, καθώς δεν είναι γνωστά, χρησιμοποιήθηκε μία σειρά Προηγμένων Οξειδωτικών Μεθόδων Αντιρρύπανσης, για να παραχθούν σε εργαστηριακή κλίμακα και να ταυτοποιηθούν με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας. Οι μέθοδοι αυτοί ήταν: αντίδραση με H_2O_2 , αντίδραση Fenton, Φωτόλυση σε ακτινοβολίες διαφορετικών μηκών κύματος (UVC & UVA) και Ετερογενής Φωτοκατάλυση με καταλύτη νανοσωματιδίων TiO_2 . Η αναλυτική μέθοδος παρουσίασε καλή επαναληψιμότητα (1,9 %) και αναπαραγωγιμότητα (3,3 %), ενώ σχετικά με την ευαισθησία της, το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, για τη Σουλφαδοξίνη, ήταν 0,015 mg/L και 0,05 mg/L, αντίστοιχα. Επίσης, από τα αποτελέσματα της μελέτης, προκύπτει η ταυτοποίηση 17 προϊόντων μετασχηματισμού, που αναφέρονται για πρώτη φορά, καθώς και μία εκτίμηση του μηχανισμού διάσπασης της μητρικής ένωσης. Τέλος, πραγματοποιείται στατιστική πρόβλεψη της τοξικότητας των προϊόντων μετασχηματισμού, με χρήση λογισμικού Quantitative Structure–Activity Relationship (QSAR).

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

Σουλφοναμίνες, Σουλφαδοξίνη, Προϊόντα Μετασχηματισμού, Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας, Υγρή Χρωματογραφία, Αναδύομενοι Ρύποι, Προηγμένες Οξειδωτικές Μέθοδοι Αντιρρύπανσης.



Περιεχόμενα

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	9
Κατάλογος Πινάκων	11
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	12
1. Σουλφοναμίδες (Sulfonamides).....	15
1.1. Σουλφοναμίδες στην καταπολέμηση ιών και βακτηρίων.	15
1.2. Ελονοσία (Malaria)	18
1.2.1. Μετάδοση της νόσου.	18
1.2.2. Κλινική συμπεριφορά.	19
1.2.3. Επιδημιολογικά στοιχεία.....	19
1.3. Σουλφαδοξίνη (Sulfadoxine - SDX)	20
2. Περιβαλλοντική Ρύπανση Αντιβιοτικών.....	24
2.1. Κατηγορίες φαρμακευτικών ρύπων	25
2.2. Ανάπτυξη ανοσίας στα αντιβιοτικά.	29
2.2.1. Περιορισμός της απορρόφησης φαρμάκου.	31
2.2.2. Τροποποίηση μοριακών στόχων ενός φαρμάκου.	32
2.2.3. Αδρανοποίηση φαρμάκου.	33
2.2.4. Εκροή ενεργού φαρμάκου.....	33
2.3. Ρύπανση σουλφοναμίδων.	34
2.4. Ρύπανση από προϊόντα μετασχηματισμού (TPs).	36
2.4.1. Επιπτώσεις προϊόντων μετασχηματισμού στο περιβάλλον	36
2.4.2. Προϊόντα μετασχηματισμού σουλφοναμιδικών ενώσεων.	37
3. Προηγμένες Οξειδωτικές Μέθοδοι Αντιρρύπανσης	39
3.1. Φωτόλυση με υπεριώδη ακτινοβολία.	40
3.2. Διεργασίες με βάση το υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2	41
3.2.1. H_2O_2/UV	41
3.2.2. Fe^{2+}/H_2O_2 – Fenton	42
3.2.3. $Fe^{2+}/H_2O_2/UV$ – Photo-Fenton	44
3.3. Διεργασίες με βάση το όζον O_3	45
3.3.1. O_3 - Οζονισμός.....	46
3.3.2. O_3/UV	47
3.3.3. O_3/H_2O_2	49
3.3.4. $O_3/UV/H_2O_2$	50

3.4.	TiO ₂ /UV – Ετερογενής φωτοκατάλυση.....	51
4.	Αναλυτικός Προσδιορισμός Αντιβιοτικών	54
4.1.	Κατηγορίες υποστρωμάτων περιβαλλοντικών δειγμάτων.....	54
4.1.1.	Λύματα, απόβλητα και λάσπη.....	55
4.1.2.	Επιφανειακά νερά και ιζήματα.	55
4.1.3.	Έδαφος και πόσιμο νερό.....	56
4.1.4.	Βιόκοσμος (Biota).....	56
4.2.	Αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ρύπων.....	58
4.2.1.	Αέρια χρωματογραφία – GC.....	58
4.2.2.	Υγρή χρωματογραφία – LC.	59
4.2.3.	Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση (CE).....	59
4.3.	Μελέτη και ταυτοποίηση προϊόντων μετασχηματισμού.....	60
4.3.1.	Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (HRMS).....	60
4.3.2.	Εκτίμηση τοξικότητας και περιβαλλοντικής συμπεριφοράς προϊόντων μετασχηματισμού.....	62
5.	Οργανολογία, Αντιδραστήρια και Εξοπλισμός.....	66
6.	Ανάπτυξη Αναλυτικής Μεθόδου.....	70
7.	Αναλύσεις Δειγμάτων Από ΠΟΜΑ Διαφορετικών Μηχανισμών.	72
7.1.	Προσθήκη H ₂ O ₂	72
7.2.	Fenton.	73
7.3.	Φωτόλυση με ακτινοβολία UVC.	74
7.4.	UVC – H ₂ O ₂	74
7.5.	Φωτόλυση με ακτινοβολία UVA.	75
7.6.	Ετερογενής φωτοκατάλυση με TiO ₂	76
7.7.	Σύγκριση ΠΟΜΑ.....	77
8.	Προσδιορισμός Προϊόντων Μετασχηματισμού.....	79
8.1.	Ταυτοποίηση Σουλφαδοξίνης	79
8.2.	Ταυτοποίηση Προϊόντων Μετασχηματισμού.	81
8.3.	Μηχανισμοί σχηματισμού προϊόντων μετασχηματισμού.	87
8.4.	Εκτίμηση τοξικότητας προϊόντων μετασχηματισμού.....	90
9.	Συμπεράσματα.....	92
10.	Βιβλιογραφία	94

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1.1. Δείγμα από Prontosil	15
Εικόνα 1.2. Μονοπάτι σύνθεσης σουλφοναμίνης κατά του ιού SARS-CoV-2.....	16
Εικόνα 1.3. Συνθετική πορεία για τη 2-αζαδικυκλο[2.2.1]επτάνιο σουλφοναμίνη.....	17
Εικόνα 1.4. Συνθετική πορεία για την παραγωγή (1S)-(+)-καμφορο-10-σουλφοναμιδίου, με ανασταλτικές ιδιότητες ενάντια στον ιό του Ebola	17
Εικόνα 1.5. Συνθετική πορεία για τη σύνθεση σουλφοναμιδίου που περιέχει πουρίνη στο μόριό του.....	18
Εικόνα 1.6. Ζώνες μετάδοσης ελονοσίας	20
Εικόνα 1.7. Το μόριο της σουλφαδοξίνης	20
Εικόνα 1.8. Πορεία σύνθεσης της σουλφαδοξίνης.....	21
Εικόνα 1.9. Μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης φολικού οξέος.....	22
Εικόνα 1.10. Ο μηχανισμός στον οποίο παρεμβαίνει η σουλφαδοξίνη.....	23
Εικόνα 1.11. Αναπαράσταση μηχανισμού αποσιώπισης του μεταβολικού μονοπατιού σύνθεσης φολικού οξέος από τη σουλφαδοξίνη.....	23
Εικόνα 2.1. Κύκλος φαρμακευτικών αναδυόμενων ρύπων, στο υδάτινο περιβάλλον	24
Εικόνα 2.2. Μηχανισμοί αντίστασης στην αντιβιοτική δράση.....	31
Εικόνα 2.3. Γενική δομή ενός σουλφοναμιδίου	37
Εικόνα 3.1. Μονάδα επεξεργασίας αποβλήτων με εφαρμογή της μεθόδου Fenton. Στο τελευταίο τμήμα της διάταξης, υπάρχει μονάδα καθίζησης μεταλλικής λάσπης.....	43
Εικόνα 3.2. Σύστημα σύνθεσης όζοντος με ηλεκτρικές εκκενώσεις.....	45
Εικόνα 3.3. Πιλοτικό σύστημα ετερογενούς φωτοκατάλυσης, συζευγμένης με μεμβράνες υπερδιήθησης κοίλων οινών (PMR), από τις εγκαταστάσεις του ΕΦΕΜ, ΕΚΕΤΑ.	51
Εικόνα 4.1. Βήματα αναλυτικής διαδικασίας για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ρύπων σε οργανισμούς ενός οικοσυστήματος	56
Εικόνα 4.2. Διάγραμμα ροής αέριας χρωματογραφίας.....	57
Εικόνα 4.3. Διάγραμμα ροής υγρής χρωματογραφίας.....	58
Εικόνα 4.4. Εικονική αναπαράσταση τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης	59
Εικόνα 5.1. Φωτόμετρο τύπου Pharo 300 Spectroquant	65
Εικόνα 5.2. HPLC τύπου CBM-20A, με ανιχνευτή Diode Array, της εταιρείας Shimadzu Europa GmbH	66
Εικόνα 5.3. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας MS/MS, τύπου Q Exactive™ Focus Orbitrap, της εταιρείας Thermo Fisher Scientific	66
Εικόνα 5.4. Σύστημα TOC-L, της εταιρείας Shimadzu Europa GmbH	67
Εικόνα 5.5. Λογισμικό για το σχεδιασμό προϊόντων μετασχηματισμού, Chemdraw	67
Εικόνα 5.6. Μονάδα φωτοκαταλυτικών και φωτολυτικών Προηγμένων Οξειδωτικών Μεθόδων Αντιρρύπανσης.....	68
Εικόνα 5.7. Λαμπτήρες UVA	68
Εικόνα 6.1. Φάσμα απορρόφησης της Σουλφαδοξίνης	69
Εικόνα 6.2. Καμπύλες βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό Σουλφαδοξίνης. Α) Διάλυμα φωσφορικού άλατος/μεθανόλη 60/40, Β) Νερό/μεθανόλη 60/40	70
Εικόνα 7.1. Χρωματογραφήματα για την κινητική της διεργασίας με H ₂ O ₂ , για την διάσπαση Σουλφαδοξίνης.....	71
Εικόνα 7.2. Χρωματογραφήματα για την κινητική της διεργασίας με Fenton, για την διάσπαση Σουλφαδοξίνης.....	72
Εικόνα 7.3. Χρωματογραφήματα για την κινητική της διεργασίας με UVC, για την διάσπαση Σουλφαδοξίνης.....	73

Εικόνα 7.4. Χρωματογραφήματα για την κινητική της διεργασίας με UVC – H ₂ O ₂ , για την διάσπαση Σουλφαδοξίνης	74
Εικόνα 7.5. Χρωματογραφήματα για την κινητική της διεργασίας με UVA, για την διάσπαση Σουλφαδοξίνης.....	75
Εικόνα 7.6. Χρωματογραφήματα για την κινητική της διεργασίας με UVA/TiO ₂ , για την διάσπαση Σουλφαδοξίνης	75
Εικόνα 7.7. Γραφική αναπαράσταση των κινητικών διάσπασης Σουλφαδοξίνης, από διαφορετικές ΠΟΜΑ	76
Εικόνα 7.8. Γράφημα απομάκρυνσης Σουλφαδοξίνης και Ολικού Οργανικού Άνθρακα, από διαφορετικές ΠΟΜΑ	77
Εικόνα 8.1. Θραύσματα Σουλφαδοξίνης που ανιχνεύθηκαν με χρήση Orbitrap - HRMS .	79
Εικόνα 8.2. Φάσμα μαζών από θραύσματα Σουλφαδοξίνης	79
Εικόνα 8.3. Το προϊόν μετασχηματισμού TP156 και τα θραύσματά του.....	81
Εικόνα 8.4. Το προϊόν μετασχηματισμού TP132 και τα θραύσματά του.....	81
Εικόνα 8.5. Το προϊόν μετασχηματισμού TP305 και τα θραύσματά του.....	82
Εικόνα 8.6. Το προϊόν μετασχηματισμού TP217 και τα θραύσματά του.....	82
Εικόνα 8.7. Το προϊόν μετασχηματισμού TP302 και τα θραύσματά του.....	83
Εικόνα 8.8. Το προϊόν μετασχηματισμού TP290 και τα θραύσματά του.....	83
Εικόνα 8.9. Το προϊόν μετασχηματισμού TP244 και τα θραύσματά του.....	84
Εικόνα 8.10. Το προϊόν μετασχηματισμού TP247a και τα θραύσματά του	84
Εικόνα 8.11. Το προϊόν μετασχηματισμού TP247b και τα θραύσματά του.....	85
Εικόνα 8.12. Χρωματογράφημα, με τις κορυφές των ισομερών TP247	85
Εικόνα 8.13. Το προϊόν μετασχηματισμού TP202 και τα θραύσματά του.....	86
Εικόνα 8.14. Το προϊόν μετασχηματισμού TP180 και τα θραύσματά του.....	86
Εικόνα 8.15. Μηχανισμός σχηματισμού των TP156, TP173, TP142 και TP132.....	87
Εικόνα 8.16. Μηχανισμός σχηματισμού των TP247a, TP247b, TP237, TP223 και TP202... ..	88
Εικόνα 8.17. Μηχανισμός σχηματισμού των TP247a, TP180 και TP148.....	88
Εικόνα 8.18. Μηχανισμός σχηματισμού των TP302, TP290, TP244 και TP242.....	89
Εικόνα 8.19. Μηχανισμός σχηματισμού των TP217 και TP305	89
Εικόνα 8.20. Γραφική αναπαράσταση της ταξινόμησης των προϊόντων μετασχηματισμού σε κατηγορίες τοξικότητας	90

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 3.1. Κατηγορίες ΠΟΜΑ	39
Πίνακας 7.1. Κινητική διεργασίας με H_2O_2	71
Πίνακας 7.2. Κινητική διεργασίας Fenton	73
Πίνακας 7.3. Κινητική διεργασίας με UVC.....	73
Πίνακας 7.4. Κινητική διεργασίας με UVC/ H_2O_2	74
Πίνακας 7.5. Κινητική διεργασίας με UVA	75
Πίνακας 7.6. Κινητική διεργασίας Ετερογενούς Φωτοκατάλυσης.....	76
Πίνακας 8.1. Αποτελέσματα θραυσμάτων Σουλφαδοξίνης από ανάλυση Orbitrap-HRMS	78
Πίνακας 8.2. Αποτελέσματα HRMS.....	80

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

CAS - Chemical Abstracts Service - Υπηρεσία Chemical Abstracts

DAD - Diode Array Detector - Ανιχνευτής συστοιχίας φωτοдиодων

ECD - Electrone Capture Detector - Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων

ECOSAR - Ecological Structure Activity Relationships

FID - Flame Ionization Detector - Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας

GC - Gas Chromatography - Αέρια Χρωματογραφία

HGT - Horizontal Gene Transfer - Οριζόντια Μεταφορά Γονιδίων

HPLC - High Performance Liquid Chromatography - Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

HRMS - High Resolution Mass Spectrometry - Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας

LLE - Liquid-Liquid Extraction - Εκχύλιση Υγρής-Υγρής Φάσης

MAME - Microwave Assisted Micellar Extraction - Μικκυλιακή εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

NSAIDS - Nonsteroidal anti-inflammatory drugs - Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα

pABA - 4-αμινοβενζοϊκό οξύ

PCPs - Personal Care Products - Προϊόντα Προσωπικής Φροντίδας

PLE - Pressurized Liquid Extraction - Υγρή Εκχύλιση υπό Πίεση

PMR - Photocatalytic Membrane Reactor - Φωτοκαταλυτικός Αντιδραστήρας Μεμβρανών

POPs - Persistent Organic Pollutants - Επίμονοι Οργανικοί Ρύποι

PPs - Pharmaceutical Pollutants - Φαρμακευτικοί Ρύποι

SPE - Solid Phase Extraction - Εκχύλιση Στερεής Φάσης

SPME - Solid Phase Microextraction - Μικροεκχύλιση Στερεής Φάσης

TOC - Total Organic Carbon - Ολικός Οργανικός Άνθρακας

TPs - Transformation Products - Προϊόντα Μετασχηματισμού

UV - Ultraviolet - Υπεριώδες

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

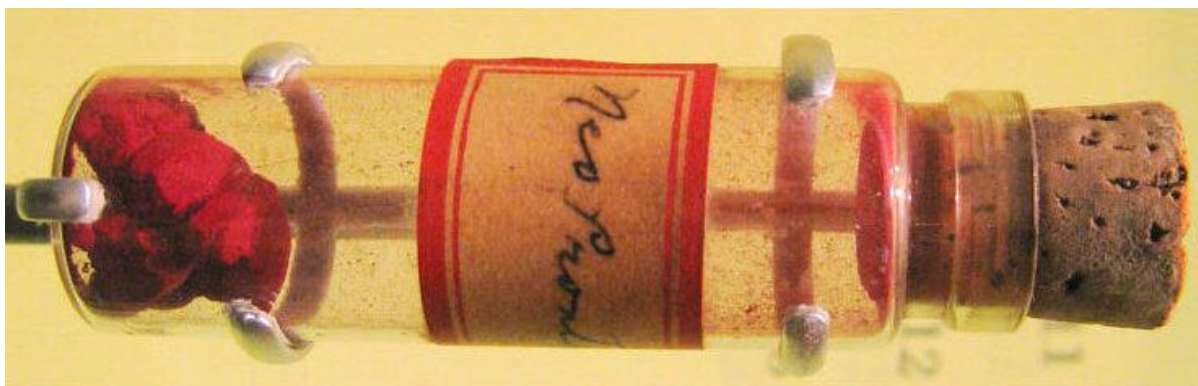
Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2023-2024, στο πλαίσιο της εκπόνησης διπλωματικής μου εργασίας, για το Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου, με τίτλο Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση. Τα πειράματα έγιναν στο Εργαστήριο Φυσικών Πόρων και Εναλλακτικών Μορφών Ενέργειας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης και στο Εργαστήριο Ελέγχου Ρύπανσης Περιβάλλοντος του Κέντρου Διεπιστημονικής Έρευνας και Καινοτομίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Ο στόχος της εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας νέας αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό του φαρμακευτικού ρύπου Σουλφαδοξίνη και των προϊόντων μετασχηματισμού του. Η σουλφαδοξίνη είναι αντιβιοτικό κατά της ελονοσίας και ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των Σουλφοναμιδών. Η αυξημένη παραγωγή και χρήση φαρμακευτικών προϊόντων οδηγεί σε σημαντική ρύπανση των υδάτων. Οι επιπτώσεις της ύπαρξης τέτοιων ρύπων σε ένα οικοσύστημα, όπως η ανάπτυξη βακτηριακής ανοσίας στα αντιβιοτικά, διαφέρουν ανάλογα με την κατηγορία, το μηχανισμό δράσης, αλλά και τη μορφή τους, ενώ από μία φαρμακευτική ουσία μπορούν να προκύψουν πολλαπλοί ρύποι, ως προϊόντα μεταβολισμού ή οξείδωσης, στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων. Τα προϊόντα αυτά, μπορούν να είναι εξίσου τοξικά και στις περισσότερες περιπτώσεις είναι άγνωστα, καθώς δεν είναι πλήρως γνωστός ο μηχανισμός σχηματισμού τους, ώστε να μπορούμε να τα προβλέψουμε. Οι Προηγμένες Οξειδωτικές Μέθοδοι Αντιρρύπανσης που χρησιμοποιούνται για την περεταίρω επεξεργασία λυμάτων, εμφανίζουν ποικίλους μηχανισμούς οξείδωσης, που μπορούν να δώσουν διαφορετικά προϊόντα. Επειδή συνήθως τέτοιες ενώσεις δεν είναι εμπορικά διαθέσιμες σαν πρότυπα ανάλυσης, πραγματοποιήθηκε εργαστηριακά μία σειρά από Προηγμένες Οξειδωτικές Μεθόδους Αντιρρύπανσης, με διαφορετική αρχή λειτουργίας, προκειμένου να παραχθούν προϊόντα μετασχηματισμού. Στη συνέχεια, η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε, βασιζόμενη στην υγρή χρωματογραφία και στην αξιοποίηση ανιχνευτή Φασματομετρίας Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας, συνέβαλε στην παρακολούθηση των επιπέδων Σουλφαδοξίνης και την ταυτοποίηση των άγνωστων ενώσεων που προέκυψαν από τις οξειδωτικές μεθόδους. Από τα αποτελέσματα της εργασίας, προέκυψε η ταυτοποίηση 17 προϊόντων μετασχηματισμού, συνοδευόμενη από εκτιμήσεις σχετικά με τους μηχανισμούς σχηματισμού και την τοξικότητά τους.

Με την ολοκλήρωση της εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Δημητρούλα Λαμπροπούλου, καθώς εκτός της εμπιστοσύνης της, κατά την ανάθεση ενός εξαιρετικά ενδιαφέροντος θέματος για την διπλωματική μου εργασία, μου παρείχε διαρκή υποστήριξη σε οποιαδήποτε δυσκολία συνάντησα, ενώ το ενδιαφέρον της παρέμενε αμείωτο. Επίσης, τα σχόλια και οι διορθώσεις της με βοήθησαν στην ολοκλήρωση της συγγραφής της παρούσας εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιστημονική ομάδα του εργαστηρίου Ελέγχου Ρύπανσης Περιβάλλοντος και την υποψήφια διδάκτορα Κυριακή Αναγνωστοπούλου, για την εξαιρετική συνεργασία μας κατά την εκπόνηση της εργασίας, μέσα σε μια ευχάριστη και φιλική ατμόσφαιρα. Τέλος, ευχαριστώ θερμά το εργαστήριο ΕΦΕΜ του ΕΚΕΤΑ για την οικονομική κάλυψη των υλικοτεχνικών αναγκών της εργασίας, καθώς και τους συνεργάτες μου, Βασίλη Σαρασίδη, Παναγιώτα Πέτση, Δρ. Αλεξάνδρα Μοσχονά. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Κωνσταντίνο Πλάκα, για την διαρκή υποστήριξη και καθοδήγηση που μου παρείχε.

1. Σουλφοναμίδες (Sulfonamides)

Η πρώτη θεραπεία με σουλφοναμίδες προτάθηκε το 1932 από τον Gerhard Domagk, ο οποίος ανακάλυψε ότι μια πορτοκαλοκόκκινη ουσία που ονομάζεται Prontosil ήταν ασφαλής και έφερε θετικά αποτελέσματα στη θεραπεία στρεπτοκοκκικών λοιμώξεων σε ποντίκια (**Εικόνα 1.1**) [1]. Μερικά χρόνια αργότερα, το 1939, τιμήθηκε με βραβείο Νόμπελ ιατρικής «για την ανακάλυψη των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων του Prontosil».



Εικόνα 1.1. Δείγμα από Prontosil [2].

Έκτοτε, οι σουλφοναμίδες αποτελούν σημαντική κατηγορία ενώσεων και μια ολόκληρη γενιά φαρμάκων. Με τα χρόνια το εύρος εφαρμογής τους περιορίστηκε σημαντικά, καθώς η ανακάλυψη φαρμάκων όπως η πενικιλίνη και άλλα φυσικά αντιβιοτικά έδωσε προτεραιότητα σε άλλα, πιο ασφαλή σκευάσματα.

Ωστόσο, η διαρκής πρόοδος στο χώρο της συνθετικής χημείας έχει δώσει τη δυνατότητα τροποποίησης των υφιστάμενων σουλφοναμινών, παράλληλα με τη σύνθεση νέων, μειώνοντας τις παρενέργειες και αυξάνοντας τόσο την απόδοση όσο και το εύρος των εφαρμογών τους. Έτσι, τα τελευταία χρόνια έχουν ελκύσει ξανά σημαντικό ενδιαφέρον από τον χώρο των βιολογικών επιστημών, καθώς έχει φανεί ότι η δράση τους δεν περιορίζεται μόνο στην αντιμετώπιση μικροβιακών λοιμώξεων. Μεταξύ άλλων, στη βιβλιογραφία αναφέρεται η αντιφλεγμονώδης δράση τους [3], καθώς και η λειτουργία τους έναντι νευρολογικών παθήσεων, όπως η νόσος Alzheimer [4], η νόσος Parkinson [5] και οι γενικές επιληπτικές κρίσεις [6]. Παράλληλα, σημαντικές φαίνεται να είναι οι προοπτικές που εμφανίζουν για αντικαρκινικές θεραπείες [7, 8].

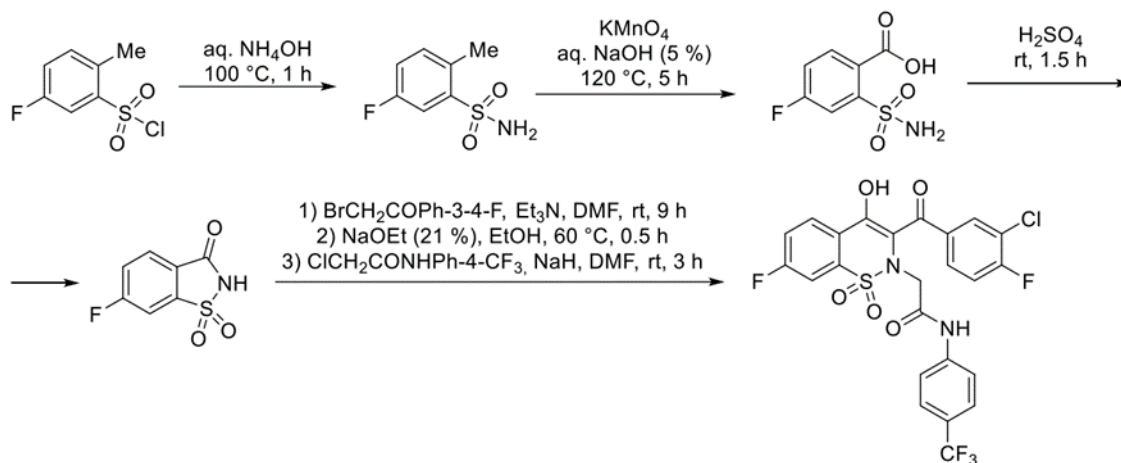
Καθώς η βασική εφαρμογή των σουλφοναμινών είναι αυτή της αποσιώπησης βιομορίων, αξίζει να αναφερθούν οι εξαιρετικές ανασταλτικές ιδιότητες και η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζουν. Για παράδειγμα, η εφαρμογή έναντι των καρβονικών ανυδρασών, πολύτιμων βιομορίων για την ενυδάτωση του διοξειδίου του άνθρακα κατά τη ρύθμιση του κυτταρικού pH, είναι αξιοσημείωτη [9, 10]. Μάλιστα, τα φαρμακευτικά προϊόντα, που λειτουργούν ως αναστολείς καρβονικής ανυδράσης και έχουν σουλφοναμίδια στην αλυσίδα τους, έχουν χαρακτηριστεί ως “αναστολείς επόμενης γενιάς” [11].

1.1. Σουλφοναμίδες στην καταπολέμηση ιών και βακτηρίων.

Όπως αναφέρθηκε ήδη, η χρόνια έρευνα στον κλάδο της οργανικής χημείας, οδήγησε σε βελτιστοποίηση των μεθόδων σύνθεσης, που με τη σειρά τους αναζωπύρωσαν την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών εντός της κατηγορίας των σουλφοναμινών. Πρακτικά, αυτό σημαίνει πως ήδη υπάρχοντα

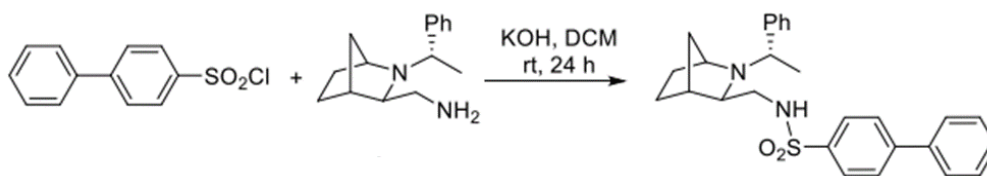
και λειτουργικά μόρια τροποποιούνται και εξειδικεύονται προς την αντιμετώπιση συγκεκριμένων βακτηρίων και ιών [10].

Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η περίπτωση σύνθεσης σουλφοναμιδίων, ειδικών προς την αντιμετώπιση του ιού SARS-CoV-2 [12]. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν και εξετάστηκαν διάφορες ενώσεις της ευρύτερης κατηγορίας, ως προς την καταλληλότητά τους για εφαρμογή σε φαρμακευτική αγωγή. Το ετεροκυκλικό μόριο που προκύπτει από την συνθετική πορεία της **Εικόνας 1.2**, φάνηκε να είναι το βέλτιστο που προέκυψε από την εν λόγω εργασία, καθώς παρουσίασε καλή μεταβολική σταθερότητα, χαμηλή κυτταροτοξικότητα, ενώ η βιοδιαθεσιμότητά του κατόπιν στοματικής λήψης ήταν αρκετά ικανοποιητική (77%). Επιπλέον, το συγκεκριμένο μόριο δεν αλληλοεπιδρούσε με το μεταβολικό μονοπάτι του γονιδίου hERG [12]. Το συγκεκριμένο γονίδιο (human ether-a-go-go-related gene (hERG)) συμμετέχει στην ενεργοποίηση του καθυστερημένου ανορθωτή διάυλου καλίου (I_{Kr}) και συγκεντρώνει σημαντικό ενδιαφέρον στην φαρμακολογία και τη σύνθεση αντιψύκων, καθώς είναι ευαίσθητο στις αλληλεπιδράσεις με αυτά τα σκευάσματα. Η παρεμβολή με το μεταβολισμό του θα μπορούσε να αποβεί μοιραία, προκαλώντας ισχαιμικά επεισόδια και αιφνίδιο θάνατο [13].



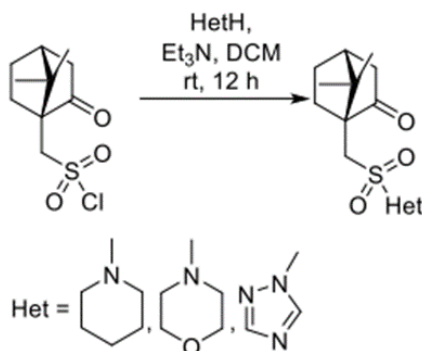
Εικόνα 1.2. Μονοπάτι σύνθεσης σουλφοναμίνης για την καταπολέμηση του ιού SARS-CoV-2 [10].

Στη βιβλιογραφία επίσης αναφέρεται η σύνθεση σουλφοναμιδίων, που περιέχει ένα αζακυκλικό μέρος [14, 15]. Συγκεκριμένα, ένα 2-Αζαδικυκλο[2.2.1]επτάνιο ενσωματώθηκε σε μια συνθετική σουλφοναμίνη (**Εικόνα 1.3**), που φάνηκε να μπορεί να ανταποκριθεί στην καταπολέμηση του καρδιοϊού A (EMCV) [16]. Ο συγκεκριμένος RNA ιός προσβάλλει πολλαπλά συστήματα, συμπεριλαμβανομένων αυτών του μυοκαρδίου και του νευρικού συστήματος, προκαλώντας παθήσεις, όπως νευρολογικές ασθένειες, ανωμαλίες του αναπαραγωγικού συστήματος, διαβήτη και άλλα [17]. Παρόλο που αυτή ήταν η επικρατέστερη προτεινόμενη εφαρμογή του εν λόγω φαρμάκου, φάνηκε να παρουσιάζεται σχετική ανταπόκριση και στην αντιμετώπιση του HPIV-3 [10]. Ένα βασικό μειονέκτημα αυτής της σουλφοναμίνης ήταν το γεγονός ότι εμφάνισε υψηλή κυτταροτοξικότητα, όπως φάνηκε στον σχετικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε [16].



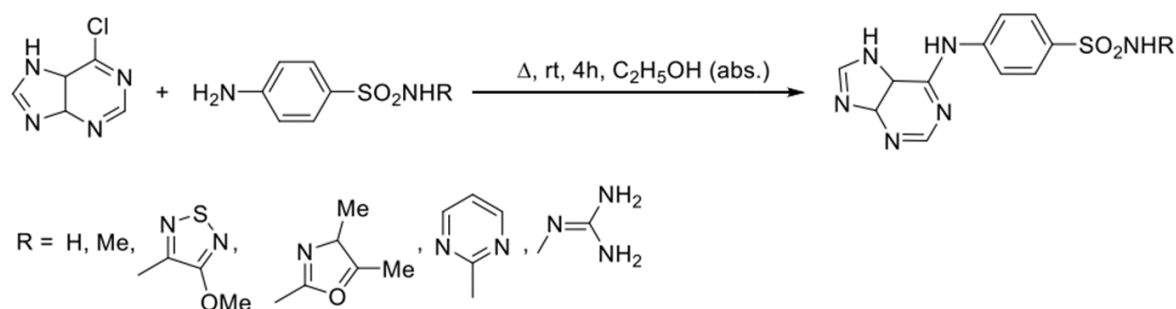
Εικόνα 1.3. Συνθετική πορεία για τη 2-αζαδικοκλω[2.2.1]επτανιο σουλφοναμίνη [10].

Ανάλογες περιπτώσεις έχουν εξεταστεί για την αντιμετώπιση των ιών της κατηγορίας “Filoviruses”. Χαρακτηριστικό στέλεχος του συγκεκριμένου είδους, που αποτελούνται από RNA μονοκλωνικούς ιούς, είναι ο ιός του Reston, γνωστός και ως Ebola [18]. Το σουλφοναμίδιο που προκύπτει από τη συνθετική πορεία της **Εικόνας 1.4**, μελετήθηκε σε σχέση με το φάρμακο της σετραλίνης. Η σετραλίνη έχει αποδειχθεί ως ένα αποτελεσματικό φαρμακευτικό προϊόν απέναντι στον ιό του Ebola. Συνεπώς, η αξιοποίηση του ως σημείο αναφοράς σε σχετική μελέτη, ήταν αναγκαία. Τα αποτελέσματα της εν λόγω μελέτης έδειξαν ότι το προτεινόμενο σουλφοναμίδιο παρουσίασε ανασταλτική δράση έναντι των γλυκοπρωτεϊνών του ιού Ebola, που ήταν συγκρίσιμη με αυτή της σετραλίνης [19]. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται γενικά πως οι σουλφοναμίδες που περιέχουν δικυκλικά τμήματα, καμφορά ή τμήματα βορνεόλης παρουσιάζουν ικανοποιητική ανασταλτική δράση έναντι επικίνδυνων παθογόνων [20].



Εικόνα 1.4. Συνθετική πορεία για την παραγωγή (1S)-(+)-καμφορο-10-σουλφοναμιδίου, με ανασταλτικές ιδιότητες ενάντια στον ιό του Ebola [10].

Η σύγχρονη βιομηχανία της σύνθεσης και παρασκευής φαρμάκων φαίνεται να μετατοπίζει αισθητά το ενδιαφέρον της σε μια κατηγορία οργανικών ενώσεων, τις πουρίνες. Οι πουρίνες είναι πολύ πολύτιμα οργανικά μόρια με ιδιαίτερες φαρμακευτικές ιδιότητες. Παράλληλα, είναι πολύ σημαντικό ότι εμφανίζονται στη φύση, γεγονός που ενισχύει τις προοπτικές για κλιμάκωση της παραγωγής σχετικών φαρμάκων, ώστε μελλοντικά να καταστεί ευρεία η εφαρμογή τους [21]. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται διάφορες περιπτώσεις όπου πουρινικά μόρια παρουσιάζουν ανασταλτική δράση απέναντι σε ιούς και μικρόβια, όπως ο HIV [22–24] και ο ιός της ηπατίτιδας B [25], ενώ έχει φανεί πως απενεργοποιούν τις επιβλαβείς EGFR πρωτεΐνες (πρωτεΐνες του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα) [26]. Μια περίπτωση σουλφοναμιδίου που περιέχει πουρίνη στο μόριό του προκύπτει από τη συνθετική εικόνα της **Εικόνας 1.5**.



Εικόνα 1.5. Συνθετική πορεία για τη σύνθεση σουλφοναμιδίου που περιέχει πουρίνη στο μόριό του [10].

Τα όσα παρουσιάστηκαν παραπάνω αποτελούν μόλις μία μικρή ένδειξη του μεγάλου φάσματος των εφαρμογών και των δυνατοτήτων που διαθέτουν τα σουλφοναμίδια. Η ποικιλία που παρουσιάζεται χάρη στις πολλαπλές συνθετικές διεργασίες που έχουν αναπτυχθεί, καθώς και οι ενδείξεις σημαντικής ανασταλτικής δράσης, φανερώνουν τις μεγάλες προοπτικές για κλιμάκωση της χρήσης τους στις μελλοντικές θεραπευτικές στρατηγικές.

1.2. Ελονοσία (Malaria)

Η ελονοσία (malaria) θεωρείται ως μία εκ των σημαντικότερων ασθενειών της παγκόσμιας ιστορίας. Ιστορικά εντοπίζεται σε περιοχές της Αφρικής και της Ασίας, με αναφορές να ξεκινάνε από το 2700 π.Χ. (Αίγυπτος και Κίνα). Με τις εκστρατείες δημιουργίας αποικιών, το εμπόριο σκλάβων και τους συνεχείς πολέμους έφτασαν να εντοπίζονται κρούσματα ακόμη και στον βόρειο Καναδά, μετατρέποντας μία τοπική επιδημία σε ένα παγκόσμιο πρόβλημα [27].

1.2.1. Μετάδοση της νόσου.

Η ελονοσία μεταδίδεται κατά βάση με θηλυκά κουνούπια του είδους *Anopheles quadrimaculatus* Say - *Anopheles stephensi*, όταν αυτά είναι φορείς ενός μολυσματικού παρασίτου ή «σποροζωίτη» [27, 28]. Ουσιαστικά, ο μηχανισμός μετάδοσης της ασθένειας αποτελείται από έναν δυναμικό κύκλο αλληλεπίδρασης ανθρώπων και κουνουπιών.

Ο σποροζωίτης αναπτύσσεται στους σιελογόνους αδένες ενός μολυσμένου κουνουπιού. Έτσι, κατά της λήψη αίματος από έναν άνθρωπο, απελευθερώνονται κλώνοι του στο εσωτερικό του τραύματος [29]. Μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, αυτοί κατευθύνονται στο ήπαρ, όπου και πολλαπλασιάζονται με ραγδαίο ρυθμό. Σαν επόμενο στάδιο της μόλυνσης, το παράσιτο εξέρχεται του ήπατος και εισχωρεί στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Εκεί τείνει να συνεχίσει την ανάπτυξή του. Σε περίπτωση έγκαιρης ανταπόκρισης του ανοσοποιητικού και φαρμακευτικής περίθαλψης οι σποροζωίτες εξοντώνονται και άρα δεν υπάρχει αύξηση στον αριθμό τους. Σε διαφορετική περίπτωση, εμφανίζεται ραγδαίος πολλαπλασιασμός και επέκτασή τους, καθώς τρέφονται από την αιμοσφαιρίνη, οδηγώντας σε κλινικές επιπτώσεις για τον ασθενή [27, 30]. Για να ολοκληρωθεί ο κύκλος μετάδοσης της ελονοσίας, πρέπει ένα κουνούπι να τραφεί με αίμα ανθρώπου που φέρει το παράσιτο και συνεπώς να μολυνθεί. Σε αυτήν την περίπτωση η ανάπτυξη εντός των ερυθρών αιμοσφαιρίων συνεχίζει, έως ότου λυθεί η κυτταρική μεμβράνη τους και απελευθερωθούν μικρογαμέτες των παρασίτων. Μόλις δημιουργηθούν τα ζυγωτά, δημιουργούν μία κύστη («ωοκύστη») στο εντερικό σύστημα του εντόμου, που μόλις ωριμάσει καταστρέφεται,

απελευθερώνοντας σποροζώιτες στους σιελογόνους αδένες. Από αυτό το στάδιο και έπειτα το έντομο έχει μολυσματικό χαρακτήρα, ολοκληρώνοντας τον κύκλο μετάδοσης [27, 29, 31].

Συνολικά υπάρχουν 6 στελέχη παρασίτων που μπορούν να προσβάλλουν τον άνθρωπο:

1. *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*)
2. *Plasmodium vivax* (*P. Vivax*)
3. *Plasmodium ovale wallickeri* (*P. Ovale*)
4. *Plasmodium ovale curtisi* (*P. Ovale*)
5. *Plasmodium malariae* (*P. Malariae*)
6. *Plasmodium knowlesi* (*P. Knowlesi*)

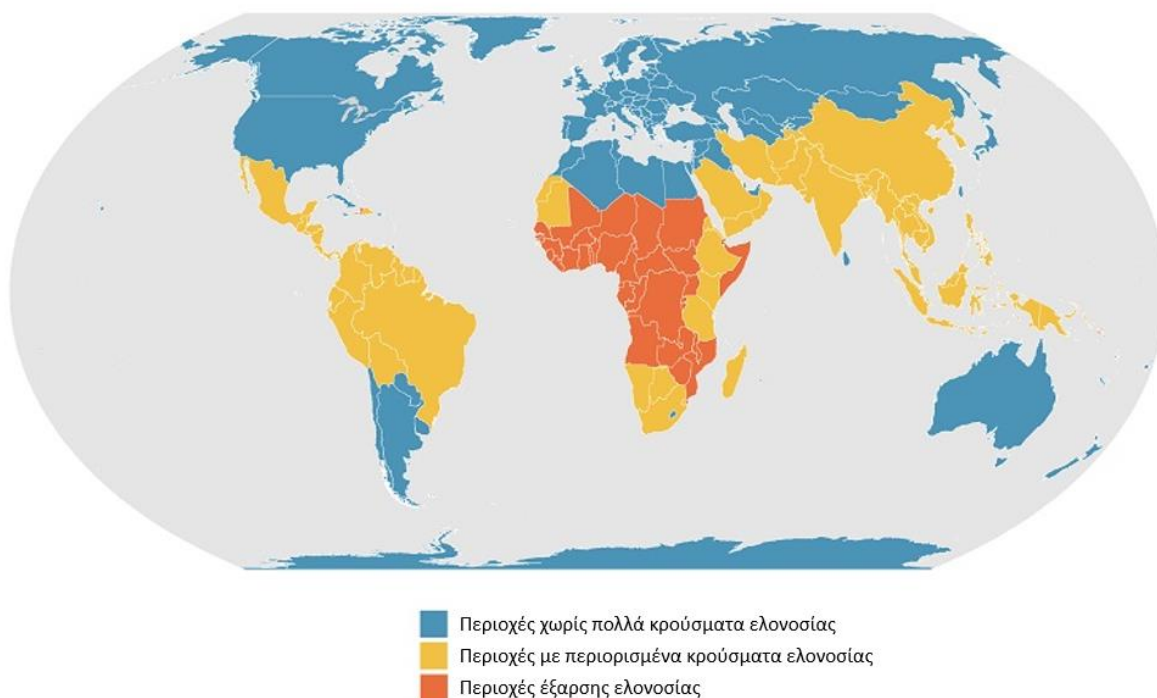
Οι διαφοροποιήσεις των συγκεκριμένων στελεχών αφορούν τόσο τον χρόνο επώασης και ανάπτυξης τους στον ανθρώπινο οργανισμό, όσο και την σοβαρότητα των συμπτωμάτων. Αξίζει να αναφερθεί η σημαντική επιθετικότητα των στελεχών *P. Falciparum* και *P. Knowlesi*, καθώς αναπτύσσονται ταχύτατα (8-12 μέρες), προσβάλλουν όλα τα ερυθροκύτταρα (νέα και ηλικιωμένα), ενώ προκαλούν σοβαρή αναιμία, επίμονο πυρετό και εμπλοκή του κεντρικού νευρικού συστήματος [27, 32–34].

1.2.2. Κλινική συμπεριφορά.

Η κλινική συμπεριφορά της ελονοσίας εμφανίζει ιδιαίτερη ποικιλία. Συνήθως, τα αρχικά στάδια της μόλυνσης δεν συνοδεύονται από κάποιο σύμπτωμα. Σε επόμενη φάση, η κύρια κλινική εικόνα είναι ο πυρετός. Ωστόσο, λόγω της απώλειας συγκεκριμένου μοτίβου θερμοκρασίας, είναι ιδιαίτερα δύσκολη η διάγνωση. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο ασθενής εμφανίζει ήπιο πυρετό με έντονες κορυφώσεις που δεν παρουσιάζουν περιοδικότητα. Σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου, παρατηρείται λύση των ερυθροκυττάρων που προκαλεί αναιμία, σπληνομεγαλία και κλασικό παροξυσμό. Ο παροξυσμός είναι κλασικό σύμπτωμα ελονοσίας, ωστόσο σε πολλές περιπτώσεις αργεί να εμφανιστεί, φτάνοντας σε πολύ προχωρημένα στάδια μόλυνσης. Παράλληλα, επειδή η συμπεριφορά πρώιμων σταδίων είναι κοινή με πολλές παθήσεις, όπως γαστρεντερίτιδα, πνευμονία, μηνιγγίτιδα και άλλα, η διάγνωση εξειδικεύεται σημαντικά σε περιπτώσεις που έχουν βρεθεί πρόσφατα σε περιοχές μετάδοσης ελονοσίας [27, 32, 35, 36].

1.2.3. Επιδημιολογικά στοιχεία.

Αυτή τη στιγμή, τουλάχιστον το 40% του παγκόσμιου πληθυσμού ζει σε ενδημική κατάσταση, με τουλάχιστον 90 χώρες να πλήττονται ενεργά (**Εικόνα 1.6**). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι ετήσιες μόλυνσης να φτάνουν τις 500 εκατομμύρια, ενώ οι νεκροί (μεταξύ αυτών πολλά παιδιά) μπορούν να ξεπερνούν τα 2 εκατομμύρια [37].

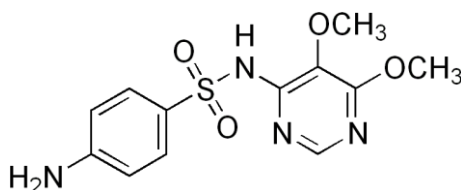


Εικόνα 1.6. Ζώνες μετάδοσης ελονοσίας [37].

Η ανάπτυξη του παρασίτου και συνεπώς η έξαρση της νόσου συνδέεται άρρηκτα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες της περιοχής (θερμοκρασία και υγρασία). Τόσο το πλασμάδιο όσο και τα κουνούπια ευδοκιμούν σε θερμοκρασίες που ξεπερνούν τους 23-24°C και προς το παρόν εντοπίζονται στην τροπική ζώνη, δηλαδή την κεντρική Αφρική [38, 39]. Ωστόσο, το εν εξελίξει φαινόμενο της διαρκούς αύξησης της θερμοκρασίας προβλέπεται πως θα μετατοπίσει σημαντικά την σφαίρα έξαρσης της ελονοσίας. Ενδεικτικά, έρευνες αναφέρουν πως μία αύξηση 3°C στη μέση θερμοκρασία του πλανήτη, θα οδηγούσε σε επέκταση των περιοχών ανάπτυξης ελονοσίας σε ένα εύρος που θα κάλυπτε πλήρως την Ινδία και πιθανό να έφτανε μέχρι και το Ηνωμένο Βασίλειο. Πρακτικά αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε αύξηση των ετήσιων κρουσμάτων ακόμα και κατά 80 εκατομμύρια [40, 41].

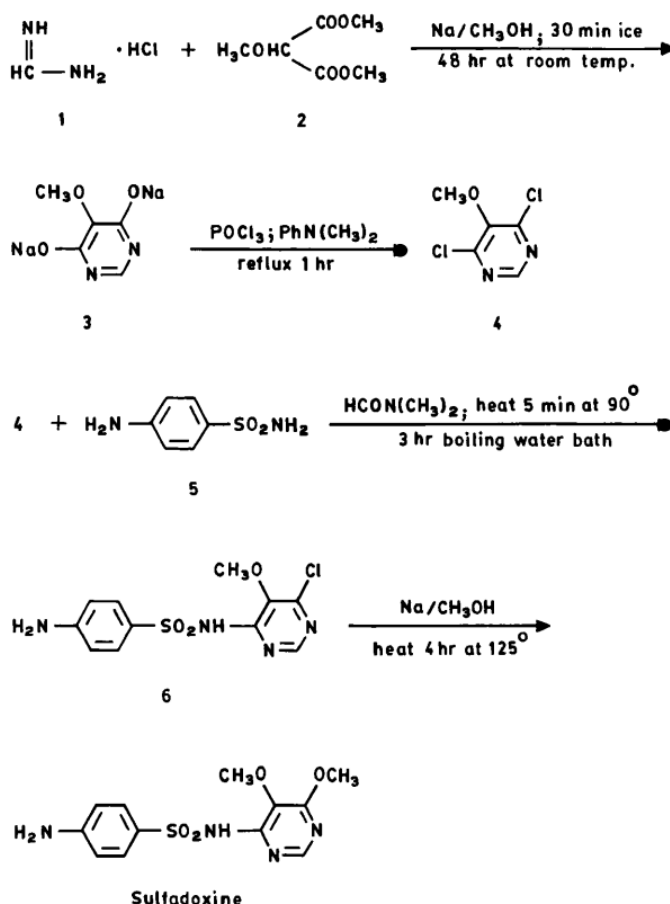
1.3. Σουλφαδοξίνη (Sulfadoxine - SDX)

Η σουλφαδοξίνη (Εικόνα 1.7), με μοριακό τύπο $C_{12}H_{14}N_4O_4S$, είναι ένα συνθετικό αντιβιοτικό, που ανήκει στην κατηγορία των σουλφοναμίδων και κατασκευάστηκε πρώτη φορά από χημικούς της εταιρείας F. Hoffmann-La Roche & Co.



Εικόνα 1.7. Το μόριο της σουλφαδοξίνης.

Στην Εικόνα 1.8 παρουσιάζεται η πορεία της βιομηχανικής σύνθεσης της σουλφαδοξίνης, όπως καθορίστηκε από της εταιρεία που κατέχει την πατέντα (F. Hoffmann-La Roche & Co, Ελβετία) [42].



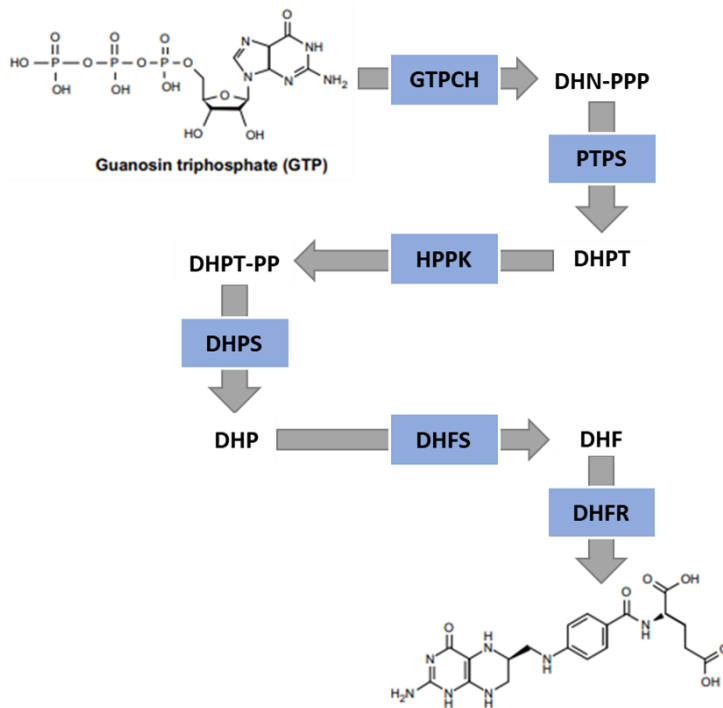
Εικόνα 1.8. Πορεία σύνθεσης της σουλφαδοξίνης [42].

Εμπορικά είναι συνήθως διαθέσιμη σε μορφή άοσμης λευκής ή ελαφρώς κίτρινης (creamy white) κρυσταλλικής σκόνης. Το μοριακό βάρος της είναι 310,33 g/mol και το σημείο τήξης της κυμαίνεται εντός του εύρους 190–194 °C. Όσον αφορά τη διαλυτότητά της, η σουλφαδοξίνη είναι ελαφρώς διαλυτή στο νερό, με διαλυτότητα 0,296 mg/mL. Παρομοίως, εμφανίζει περιορισμένη διαλυτότητα στην αιθανόλη, ενώ είναι σημαντικά πιο διαλυτό σε διμεθυλοφορμαμίδιο [42, 43].

Η χημική φύση της σουλφαδοξίνης την κατατάσσει ως ασθενές οξύ, με τιμή pKa 6,1. Αυτή η οξύτητα συμβάλλει στις φαρμακολογικές του ιδιότητες και επηρεάζει τη συμπεριφορά του σε διάφορα χημικά περιβάλλοντα. Όσον αφορά τη σταθερότητα της, η σουλφαδοξίνη είναι σχετικά σταθερή υπό κανονικές συνθήκες. Ωστόσο, είναι ευαίσθητο όταν εκτίθεται στο φως και τη θερμότητα [43].

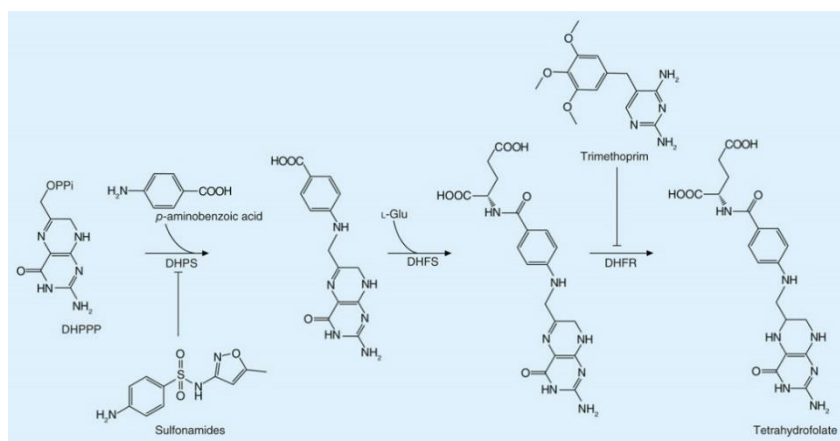
Η βασική της εφαρμογή είναι στο χώρο της ιατρικής και της φαρμακολογίας, καθώς η σουλφαδοξίνη είναι ιδιαίτερα γνωστή για την αποτελεσματικότητά της έναντι ενός ευρέος φάσματος βακτηριακών και πρωτοζωικών λοιμώξεων και ειδικότερα στη θεραπεία της ελονοσίας. Ωστόσο, πέρα από τις αντιελονοσιακές της ιδιότητες, η σουλφαδοξίνη έχει βρει χρησιμότητα στην καταπολέμηση διαφόρων βακτηριακών λοιμώξεων, αποδεικνύοντας την ευελιξία της ως αντιμικροβιακό προϊόν. Οι φαρμακοκινητικές του ιδιότητες και ο παρατεταμένος χρόνος ημιζωής συμβάλλουν στην αποτελεσματικότητά της, επιτρέποντας την εφαρμογή μειωμένης συχνότητας δόσεων σε σύγκριση με άλλα αντιβιοτικά.

Η σουλφαδοξίνη αποτελεί αναστολέα της διυδροπτεροϊκής συνθάσης (DHPS), ενός κρίσιμου ενζύμου στην οδό σύνθεσης φολικού οξέος των μικροβιακών οργανισμών. Κατά τη θεραπεία της ελονοσίας το αντιβιοτικό χορηγείται συνεργιστικά με την πυριμεθαμίνη που αναστέλλει το ένζυμο της διυδροφολικής αναγωγάσης (DHFR), επίσης μέρος της σύνθεσης φολικού οξέος [44].



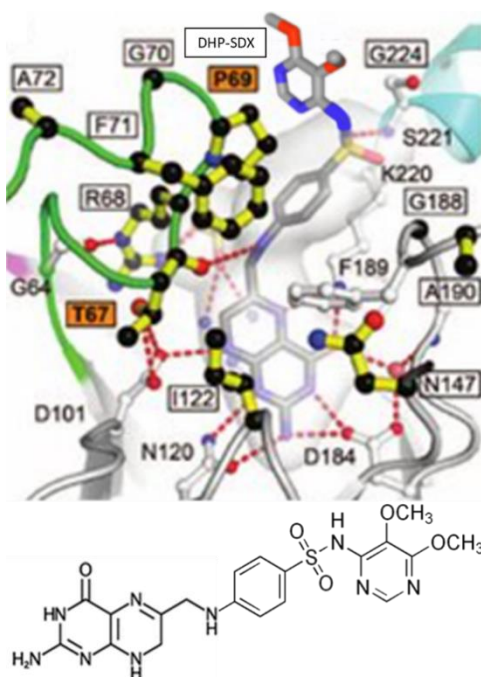
Εικόνα 1.9. Μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης φολικού οξέος [44].

Η DHPS και το DHFR αποτελούν στάδια ενός ευρύτερου μεταβολικού μονοπατιού βιοσύνθεσης φολικού οξέος (Εικόνα 1.9). Το μόριο αυτό αποτελεί έναν ζωτικής σημασίας παράγοντα που συμμετέχει στον μεταβολισμό της μεταφοράς μονάδων άνθρακα (C1 units). Συγκεκριμένα, στην σύνθεση του DNA το συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι μετατρέπει μεθυλομάδες σε τριφωσφορικά που χρησιμοποιεί η DNA πολυμεράση για να προσθέσει το αμινοξύ της θυμίνης (T) [44]. Η DHPS καταλύει την αντίδραση του 4-αμινοβενζοϊκού οξέος (pABA) με την 7,8-πυροφωσφορική-διυδροπτερίνη (DHPPP), ώστε να σχηματιστεί το 7,8-διυδροπτεροϊκό οξύ (Εικόνα 1.10) [45, 46]. Σε επόμενα βήματα αυτό μετατρέπεται σε διυδροφολικό οξύ. Το DHFR καταλύει την αναγωγή του διυδροφολικού σε τετραϋδροφολικό, δηλαδή σε φολικό οξύ [47, 48].



Εικόνα 1.10. Ο μηχανισμός σύνθεσης φολικού οξέος στον οποίο παρεμβαίνει η σουλφαδοξίνη (ή οι σουλφοναμίδες) [17].

Το pABA, άρα και το 7,8-διυδροπτεροϊκό οξύ, έχουν μία ρίζα υδροξυλίου στο καρβοξυλικό τους άκρο. Το DHFS στο επόμενο βήμα της σύνθεσης προσβάλλει αυτή τη ρίζα, μέσω μιας πυρηνόφιλης αντίδρασης υποκατάστασης με την αμινομάδα της L-γλουταμίνης, παράγοντας διυδροφολικό οξύ. Επειδή η σουλφαδοξίνη δεν έχει ρίζες υδροξυλίου στο μόριο της, η αλληλεπίδρασή της με το DHPPP (Εικόνα 1.11), που καταλύεται από την DHPS, αποσβένει το μεταβολικό μονοπάτι [49]. Διαταράσσοντας την ομαλή λειτουργία της βιοσύνθεσης φολικού οξέος, εμποδίζεται τελικά η παραγωγή νουκλεϊκών οξέων, που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μολυσματικών παθογόνων.

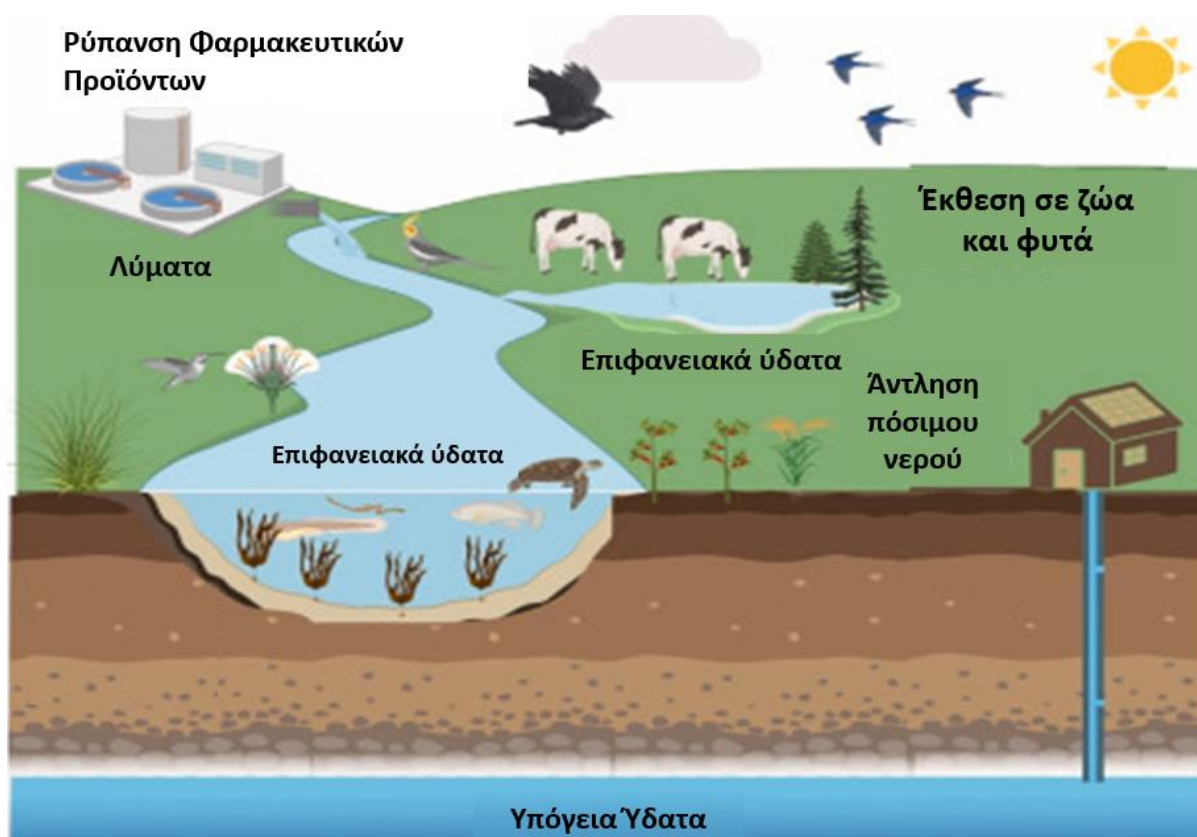


Εικόνα 1.11. Αναπαράσταση μηχανισμού αποσιώπησης του μεταβολικού μονοπατιού σύνθεσης φολικού οξέος από τη σουλφαδοξίνη [49].

Παρά τα θεραπευτικά της οφέλη, η χρήση της σουλφαδοξίνης δεν πρέπει να είναι άσκοπη. Ζητήματα όπως η ανάπτυξη αντοχής και οι πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις απαιτούν μια συνετή προσέγγιση στη χορήγησή της.

2. Περιβαλλοντική Ρύπανση Αντιβιοτικών

Σύμφωνα με το Γεωλογικό Ινστιτούτο των Ηνωμένων Πολιτειών, ως αναδυόμενοι ρύποι ορίζονται όλες οι συνθετικές ή φυσικές χημικές ουσίες που δεν περιλαμβάνονται στο πρόγραμμα παρακολούθησης ρουτίνας, αλλά έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν στο περιβάλλον και να προκαλέσουν αρνητικές επιπτώσεις, οικολογικού ή/και ανθρώπινου (ανθρώπινη υγεία) χαρακτήρα (**Εικόνα 2.1**). Οι φαρμακευτικοί ρύποι αναγνωρίζονται ως μία από τις έξι διαφορετικές κατηγορίες αναδυόμενων ρύπων [50]: προϊόντα προσωπικής φροντίδας (Personal Care Products – PCPs), ενδοκρινικοί διαταράκτες (Endocrine-Disrupting Chemicals – EDCs), φαρμακευτικοί ρύποι (Pharmaceutical Pollutants – PPs), έμμονοι οργανικοί ρύποι (Persistent Organic Pollutants – POPs), τεχνητά γλυκαντικά (Artificial Sweeteners – ASs), και μικροπλαστικά (Microplastics – MPs). Οι φαρμακευτικοί ρύποι είναι ένας τύπος αναδυόμενης περιβαλλοντικής ρύπανσης, που αναφέρεται στην παρουσία φαρμακευτικών ουσιών ή προϊόντων μεταβολισμού τους, σε διάφορα περιβαλλοντικά συστήματα. Αυτά τα χημικά είδη είναι γνωστά για την ικανότητά τους να προκαλούν επιπλοκές στην ανθρώπινη υγεία, ακόμη και σε πολύ χαμηλές δόσεις. Η ευρεία χρήση των PCPs τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί σημαντικά, με αποτέλεσμα να οδηγήσει στη εκτεταμένη συσσώρευσή τους στα οικοσυστήματα. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί και η αφομοίωσή τους από ζωντανούς οργανισμούς, μέσω της εισόδου τους σε τροφικούς ιστούς [51].



Εικόνα 2.1. Κύκλος φαρμακευτικών αναδυόμενων ρύπων, στο υδάτινο περιβάλλον [52].

Σε αυτό το κεφάλαιο θα γίνει εκτενής αναφορά σε σχετικούς ρύπους που εντοπίζονται και συνεπώς απασχολούν κυρίως υδάτινα σώματα.

2.1. Κατηγορίες φαρμακευτικών ρύπων

Οι φαρμακευτικοί ρύποι μπορούν να ταξινομηθούν σε επιμέρους κατηγορίες, βάση των ιδιοτήτων τους. Όπως είναι λογικό, η κάθε κατηγορία παρουσιάζει διαφορετικά οικοτοξικά χαρακτηριστικά και συνεπώς, είναι απαραίτητη η διάκρισή και μελέτη τους [52]. Συγκεκριμένα, οι κατηγορίες είναι:

- (i) Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs – NSAIDs). Τα NSAIDs, όπως η ιβουπροφαίνη, η δικλοφενάκη, η ναπροξένη και η ακεταμινοφαίνη, είναι φαρμακευτικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται ευρέως για τις αντιφλεγμονώδεις, αντιπυρετικές και αναλγητικές ιδιότητες τους. Η αντιπυρετική δράση αποδίδεται κυρίως στην αναστολή της παραγωγής προσταγλανδινών, που προκαλείται από την ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και την ιντερλευκίνη-6 (IL-6) στον υποθάλαμο και λόγω της αναδιοργάνωσης του θερμορυθμιστικού συστήματος, οδηγείται ο οργανισμός σε αγγειοδιαστολή και αυξημένη απώλεια θερμότητας [53]. Ο αναλγητικός χαρακτήρας πιστεύεται ότι σχετίζεται με την περιφερική αναστολή της δημιουργίας προσταγλανδινών [54]. Η αντιφλεγμονώδης δράση των NSAIDs οφείλεται στην αναστολή του ενζύμου COX ή της κυκλοοξυγενάσης, που ευθύνονται για τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδίνες [55]. Αυτά τα φαρμακευτικά προϊόντα, κυριαρχούν εμπορικά στον τομέα της φαρμακοβιομηχανίας, με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται πιο συχνά σε υδάτινα περιβάλλοντα και έτσι να έχουν συμπεριληφθεί στη λίστα με τις 10 κορυφαίες προτεραιότητες για ανίχνευση της Ευρωπαϊκής Ένωσης [56].

Οι συγκεκριμένοι ρύποι συνήθως ανιχνεύονται σε υδάτινα σώματα, λόγω του ατελούς μεταβολισμού τους και της απέκκρισης τους από τον άνθρωπο και τα ζώα. Μπορούν να φτάσουν στο περιβάλλον μέσω σταθμών επεξεργασίας αστικών ή νοσοκομειακών λυμάτων, μονάδων διαχείρισης στερεών αποβλήτων, στραγγισμάτων από χωματερές στερεών αποβλήτων ή απευθείας απόρριψης από τις φαρμακευτικές βιομηχανίες [57]. Οι ενώσεις αυτές θεωρούνται ιδιαίτερα επίμονες και ανθεκτικές στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να συναντώνται σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από ng/L έως mg/L σε διάφορα υδάτινα περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων ποταμών, λιμνών καθώς και πόσιμων υδάτων, σε όλο τον κόσμο. Λόγω της πανταχού παρουσίας τους στο υδάτινο περιβάλλον και των χρόνιων οικοτοξικών επιδράσεων στα βιοτικά συστατικά των οικοσυστημάτων, θεωρούνται αναδύομενοι ρύποι και προκαλούν ανησυχία στην επιστημονική κοινότητα [58–60].

Οι επιπτώσεις αυτών των ρύπων δεν περιορίζονται μόνο σε ζωικούς οργανισμούς και τον άνθρωπο. Δημιουργούν, μεταξύ άλλων, σοβαρά προβλήματα στις καλλιέργειες και την χλωρίδα των οικοσυστημάτων. Σε έρευνα που δημοσιεύθηκε το 2018 [61], παρατηρήθηκε μια εκπληκτική μείωση 50% στην απόδοση του αραβοσίτου, που (με την υποστήριξη ισχυρών στατιστικών δεδομένων) αποδόθηκε στην παρουσία παρακεταμόλης. Επιπλέον, η συσσώρευση παρακεταμόλης στους σπόρους και τις ρίζες, που έχει φανεί να παραμένει, εγείρει ανησυχίες για πιθανούς κινδύνους και για τους καταναλωτές. Εν τω μεταξύ, σε διαφορετική μελέτη [62], εξετάστηκε η επίδραση της κετοπροφαίνης στην ανάπτυξη δενδρυλλίων ρυζιού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, ενώ μια χαμηλή συγκέντρωση ενίσχυε οριακά την ανάπτυξη, μια υψηλή συγκέντρωση την εμπόδιζε σημαντικά. Αυτή η αναστολή προήλθε από κυτταρική δομική βλάβη, διόγκωση χλωροπλάστη, αυξημένους κόκκους αμύλου και μείωση της λειτουργικότητας των οργανιδίων του φυτού.

- (ii) Αντιβιοτικά. Τα αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων των πενικιλινών, των κεφαλοσπορινών, των τετρακυκλινών και των φθοριοκινολονών, είναι συνήθως συνταγογραφούμενα φάρμακα για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων. Σε αυτήν την κατηγορία φαρμακευτικών ρύπων ανήκουν και οι σουλφοναμιδικές ενώσεις, όπως η Σουλφαδοξίνη, που βρίσκεται στο επίκεντρο της εργασίας.

Οι αντιβιοτικές ουσίες μπορούν να χωριστούν σε ομάδες με βάση τον μηχανισμό της αντιμικροβιακής δράσης. Οι κύριοι μηχανισμοί δράσης είναι:

- Αναστολή της σύνθεσης των κυτταρικών τοιχωμάτων (π.χ. β-λακταμικά αντιβιοτικά, πενικιλίνες, γλυκοπεπτίδια και άλλα)
- Πόλωση της κυτταρικής μεμβράνης (π.χ. λιποπεπτίδια)
- Αναστολή της σύνθεσης πρωτεϊνών (π.χ. τετρακυκλίνες, οξαζολιδινόνες και άλλα)
- Αναστολή της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων (π.χ. φθοροκινολόνες)
- Αναστολή των μεταβολικών οδών των βακτηρίων (π.χ. σουλφοναμίδες και τριμεθοπρίμη) [63].

Η απόρριψη υπολειμμάτων αντιβιοτικών από μονάδες επεξεργασίας λυμάτων και γεωργικές δραστηριότητες μπορεί να συμβάλει στην παρουσία αυτών των ενώσεων στο περιβάλλον, οδηγώντας δυνητικά στην ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηρίων, απέναντι στα αντιβιοτικά [64].

Το συγκεκριμένο ζήτημα θα αναλυθεί εκτενώς σε παρακάτω ενότητα.

- (iii) Ορμόνες. Οι ορμόνες από πολλούς κατατάσσονται στα όρια μεταξύ φαρμακευτικών ρύπων και ενδοκρινικών διαταρακτών [65, 66]. Ωστόσο, περιπτώσεις όπως τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη και η τεστοστερόνη έχουν φαρμακευτική χρήση, καθώς χρησιμοποιούνται για διάφορους ιατρικούς σκοπούς, συμπεριλαμβανομένης της αντισύλληψης και της θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης.

Οι ορμόνες ταξινομούνται σε τρεις ομάδες: θηλέων (οιστρογόνα), αρρένων (ανδρογόνα) και κύησης (προγεσταγόνα). Ωστόσο, οι ορμόνες που υπάρχουν περισσότερο στα λύματα είναι τα οιστρογόνα, τα οποία μπορεί να είναι φυσικά (οιστρόνη: E1, και 17β-οιστραδιόλη: E2) ή συνθετικά (17-α-αιθινυλοιστραδιόλη ή EE2) [67, 68]. Η απόθεση οιστρογόνων στα αστικά και βιομηχανικά απόβλητα είναι περίπου 30.000 kg/έτος [69]. Οι εγκαταστάσεις καθαρισμού ή οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων δεν έχουν σχεδιαστεί για την αφαίρεση ή τον έλεγχο αυτών των ενώσεων και επομένως δεν έχουν την απαραίτητη αποτελεσματικότητα ως προς την εξάλειψή τους. Συνεπώς, οι ουσίες αυτές φτάνουν στο περιβάλλον μέσω των αποβλήτων, χωρίς καμία επεξεργασία [70].

Οι συγκεκριμένοι ρύποι επαναλαμβάνουν τη συμπεριφορά των ενδογενών ορμονών και προκαλούν αλλοιώσεις σε διάφορα συστήματα οργάνων των ζωντανών οργανισμών, όπως το ενδοκρινικό και το αναπαραγωγικό σύστημα. Μία συνέπεια της έκθεσης του ανθρώπου σε αυτούς τους ρύπους, που έχει απασχολήσει έντονα την επιστημονική κοινότητα, είναι μείωση της γονιμότητας. Σε σχετικές μελέτες, έχει παρατηρηθεί ραγδαία πτώση στην ανθρώπινη γονιμότητα, σε σχέση με στατιστικά δεδομένα από τον προηγούμενο αιώνα. Συγκεκριμένα, στη σημερινή εποχή φαίνεται πως μόλις ένας στους τέσσερεις άνδρες

παρουσιάζει βέλτιστη ποιότητα σπέρματος, κάτι που αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην έντονη έκθεση σε ρύπους ορμονών και ενδοκρινικών διαταρακτών [71].

Το ζωικό βασίλειο δέχεται εξίσου μεγάλη επιρροή. Τα ψάρια αποτελούν ίσως το είδος με την πιο άμεση σχέση αλληλεπίδρασης με τα υδάτινα σώματα. Αυτό πρακτικά έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη αρκετών ερευνών σχετικά με τις επιπτώσεις ρύπων ορμονών σε αυτούς τους οργανισμούς. Μια από τις συχνότερες περιπτώσεις είναι η «θηλυκοποίηση» των αρσενικών ειδών, από την έκθεσή τους σε οιστρογόνα. Αυτό μπορεί να εξελιχθεί είτε σε μια πρώτης τάξης επίπτωση, με αλλοίωση του σπέρματος των αρσενικών ψαριών, είτε με επιπτώσεις δεύτερης τάξης, που συχνά συνοδεύονται με μορφολογικές αλλαγές των γεννητικών οργάνων του ζώου [72]. Σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμα, έχει αναφερθεί η αριθμητική κυριαρχία των θηλυκών ατόμων ενός πληθυσμού, εκτός των φυσιολογικών πλαισίων [73].

- (iv) Ψυχοτρόπα φάρμακα. Ως ψυχοτρόπα χαρακτηρίζονται φαρμακευτικά προϊόντα, όπως τα αντικαταθλιπτικά (π.χ. φλουοξετίνη, σερτραλίνη κ.λπ.), τα αντιψυχωσικά (π.χ. ρισπεριδόνη, ολανζαπίνη κ.λπ.) και τα αγχολυτικά (π.χ. διαζεπάμη, αλπραζολάμη κ.λπ.). Η λήψη τους γίνεται κατόπιν συνταγογράφησης και προορίζονται για καταστάσεις που αφορούν την ψυχική υγεία. Ιδιαίτερη έξαρση στην ανάγκη για ψυχοτρόπα φάρμακα προκάλεσε η πανδημία του COVID-19. Συγκεκριμένα, παράγοντες όπως ο μεγάλος αριθμός θανάτων, οι περιορισμοί στην κοινωνική ζωή (λόγω καραντίνας), η αύξηση της ανεργίας, η δυνητική κατάρρευση τοπικών και ευρύτερων οικονομικών κύκλων, αλλά και ο άμεσος φόβος για την ακεραιότητά της υγείας, δημιούργησαν εντονότατη ψυχολογική πίεση σε μεγάλο μέρος του πληθυσμού [74]. Φυσικό επόμενο ήταν η αναζήτηση σχετικής φαρμακευτικής αγωγής, για τον περιορισμό των αρνητικών συνεπειών της πανδημίας στην ψυχική υγεία του ατόμου [75, 76]. Η ευρεία χρήση και ζήτηση αυτών των φαρμάκων, δεδομένης της απόρριψης ληγμένων ή αχρησιμοποίητων φαρμάκων και της απελευθέρωσης των μεταβολιτών τους από τα ανθρώπινα ούρα, οδήγησε στην απόθεση μεγάλων ποσοτήτων τους στα υδάτινα συστήματα. Αυτό όπως είναι λογικό έχει εγείρει σημαντικές περιβαλλοντικές ανησυχίες [77].

Η βιοσυσσώρευση των ψυχοτρόπων ουσιών μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στους ζωντανούς οργανισμούς, όπως ενδοκρινικές διαταραχές και αναπαραγωγικές, αναπτυξιακές και μεταβολικές ανεπάρκειες. Επιπλέον, δημοσιευμένα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι αυτοί οι αναδυόμενοι ρύποι συνήθως ανιχνεύονται σε υδάτινα συστήματα σε μέγεθος συγκεντρώσεων από ng/L έως mg/L [78].

Η τοξικότητα αυτής της κατηγορίας ρύπων είναι ιδιαίτερα ανησυχητική. Οι επιπτώσεις που έχουν στους ζωντανούς οργανισμούς των οικοσυστημάτων ποικίλουν, καθώς αυτοί οι ρύποι μπορούν να επηρεάσουν μεγάλο εύρος συστημάτων οργάνων. Σε διάφορες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί πως επηρεάζουν τη συμπεριφορά και την εγκεφαλική μορφολογία οργανισμών που βρίσκονται σε άμεση επαφή με υδάτινα σώματα [79, 80]. Αυτό καθίσταται λογικό, αν αναλογιστεί κανείς πως παρόλο που τα ψυχοτρόπα προορίζονται για τον άνθρωπο, δεν ανταποκρίνονται μόνο σε αυτόν. Τα γενετικά και μεταβολικά μονοπάτια που ενεργοποιούν ή αποσιωπούν, εμφανίζονται σε μεγάλο εύρος οργανισμών [81]. Για παράδειγμα, το νευρικό σύστημα και οι μηχανισμοί μεταφοράς σημάτων του ανθρώπου, παρουσιάζει πολλά κοινά με αυτό των ψαριών. Για αυτό το λόγο, κατά την ανάπτυξη ψυχοφαρμάκων που προορίζονται για τον άνθρωπο,

πραγματοποιούνται δοκιμασίες συμπεριφοράς και σε ψάρια [82]. Σε πτηνά του είδους *Sturnus vulgaris*, τα γνωστά Ψαρίκια ή Στούρνοι, έχει αναφερθεί πως αυτοί οι ρύποι μπορούν να προκαλέσουν μείωση του πληθυσμού τους, μειώνοντας την αναπαραγωγική έλξη μεταξύ αρσενικών και θηλυκών [83].

Τέλος, χωρίς να έχει επιβεβαιωθεί κάτι, τα ψυχοτρόπα φάρμακα, που διαφεύγουν στο περιβάλλον και έρχονται σε επαφή με τον άνθρωπο, έχουν κατηγορηθεί για την πρόκληση χρόνιων νευροψυχιατρικών διαταραχών, όπως σχιζοφρένια, νόσο Alzheimer ή ακόμα και αυτισμό σε νεογνά, καθώς έχει παρατηρηθεί πως μπορούν να επηρεάσουν τα έμβρυα αν έρθουν σε επαφή με τη μητέρα τους [84].

- (v) β-αναστολείς. Οι β-αναστολείς, όπως η προπρανολόλη και η μετοπρολόλη, χρησιμοποιούνται συνήθως για καρδιαγγειακές παθήσεις, όπως η υπέρταση. Πρόκειται για μια από τις ευρύτερα χρησιμοποιούμενες μορφές φαρμάκων. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με στατιστικά δεδομένα, ανήκουν στα 200 πιο συχνά συνταγογραφούμενα φάρμακα στις ΗΠΑ [85], ενώ η ετήσια κατανάλωσή τους, σε χώρες όπως η Γερμανία, υπολογίζεται πως ξεπερνάει τους 200 τόνους [86]. Οι β-αναστολείς λειτουργούν αναστέλλοντας την επίδραση της αδρεναλίνης στους υποδοχείς του σώματός μας, επιβραδύνοντας έτσι τα νευρικά σήματα προς την καρδιά, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο ρυθμός και ο φόρτος εργασίας της [87, 88].

Η παρουσία τους στο περιβάλλον μπορεί να προκαλέσει σημαντικές επιπτώσεις σε διαφορετικούς οργανισμούς. Οι β-αδρενεργικοί υποδοχείς έχουν κομβικό λειτουργικό ρόλο σε ψάρια και άλλα υδρόβια ζώα. Συνεπώς, μπορεί να αναμένεται ότι οι φυσιολογικές διεργασίες, που ρυθμίζονται από αυτούς τους υποδοχείς στα άγρια ζώα, μπορεί να επηρεαστούν από την παρουσία β-αναστολέων. Έτσι, παρόλο που οι β-αναστολείς είναι ασφαλείς για ανθρώπινη και κτηνιατρική χρήση, υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους αυτές οι ενώσεις μπορούν να επηρεάσουν άλλους οργανισμούς που ζουν σε ένα οικοσύστημα, όταν αυτό εκτεθεί σε σχετικούς ρύπους [89]. Συγκεκριμένα, ο τρόπος λειτουργίας τους, είναι ανάλογος με αυτόν των ενδοκρινικών διαταρακτών, με αποτέλεσμα να ανήκουν και αυτές οι ενώσεις σε αυτό το ευρύτερο πλαίσιο. Μια από τις χαρακτηριστικότερες επιπτώσεις των β-αναστολέων είναι η μείωση γονιμότητας των αρσενικών ειδών, παρεμβαίνοντας στα επίπεδα τεστοστερόνης των οργανισμών [90, 91].

- (vi) Αντιεπιληπτικά φάρμακα. τα αντιεπιληπτικά φάρμακα, συμπεριλαμβανομένης της καρβαμαζεπίνης και της φαινυτοΐνης, συνταγογραφούνται για τον έλεγχο των κρίσεων και της επιληψίας. Αυτή η ομάδα φαρμάκων χαρακτηρίζεται από μείωση της υπερβολικής νευρικής δραστηριότητας στον εγκέφαλο [92].

Ειδικότερα η περίπτωση της καρβαμαζεπίνης προκαλεί ιδιαίτερη ανησυχία στην επιστημονική κοινότητα. Το φάρμακο αυτό, όπως και όλες οι περιπτώσεις που έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα καταλήγει στα απόβλητα, λόγω της ανθρώπινης δραστηριότητας. Λόγω της μεγάλης παραγωγής του σε παγκόσμιο επίπεδο, αποτελεί πλέον μία από τις πιο κοινές περιπτώσεις αναδυόμενων ρύπων της κατηγορίας των φαρμακευτικών ενώσεων [93, 94]. Επιπλέον, η καρβαμαζεπίνη και τα προϊόντα μεταβολισμού της είναι ανθεκτικά τόσο στη μικροβιακή αποικοδόμηση, όσο στην απορρόφηση τους από τη λάσπη καθίζησης στις σύγχρονες εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών λυμάτων [95].

Εκτός των όσων αναφέρθηκαν παραπάνω, η καρβαμαζεπίνη είναι εξαιρετικά σταθερή, από χημικής απόψεως και συνεπώς, η φυσική αποικοδόμησή της στο περιβάλλον να είναι αρκετά δύσκολη, κάτι που συνιστά την ιδιότητά της σαν επίμονο ρύπο [96]. Έτσι, παρά τα χαμηλά επίπεδα της, τόσο η καρβαμαζεπίνη, όσο και τα μεταβολικά προϊόντα της, προκαλούν αισθητές επιδράσεις στους σχετικούς οργανισμούς, λόγω της μακροχρόνιας έκθεσής τους στα υδατικά συστήματα [97]. Σε διάφορα είδη υδρόβιων οργανισμών, φάνηκε ότι η επαφή τους με τον συγκεκριμένο ρύπο προκάλεσε, εκτός από διαφοροποιήσεις στη φυσιολογία τους (όπως αλλαγές στο αναπαραγωγικό σύστημα ή τα ορμονικά επίπεδα [98]) και αλλαγές συμπεριφοράς. Συγκεκριμένα, έχουν αναφερθεί χαμηλότερες αντιδράσεις στρες, υψηλότερη ταχύτητα κολύμβησης και παρατεταμένη συμπεριφορά σίτισης [98, 99].

- (vii) Σκιαγραφικοί παράγοντες: οι παράγοντες αντίθεσης, όπως οι ιωδιούχες ενώσεις που χρησιμοποιούνται σε διαδικασίες ιατρικής απεικόνισης (π.χ. ακτινογραφίες, αξονικές τομογραφίες κ.λπ.), μπορούν να εισέλθουν στο περιβάλλον μέσω ακατάλληλης απόρριψης ή απελευθέρωσης από νοσοκομεία και διαγνωστικά κέντρα. Πρόσφατα, το θέμα της περιβαλλοντικής ασφάλειας των υδάτινων πόρων που εκτίθενται σε αυτά τα υλικά έχει γίνει όλο και πιο σημαντικό. Τα ιωδιούχα σκιαγραφικά μέσα αποτελούν τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους παράγοντες, με εξετάσεις όπως την αξονική τομογραφία να απαιτούν πολύ μεγάλες ποσότητες αυτών. Τα δεδομένα δείχνουν ότι αυτά τα ιωδιούχα σκιαγραφικά μέσα καταλήγουν στα λύματα, τα επιφανειακά νερά και το πόσιμο νερό, σε πολλές περιοχές του κόσμου [100].

Αυτή η κατηγορία ρύπων χαρακτηρίζεται από μία ιδιαίτερη συμπεριφορά. Τα ιωδιούχα σκιαγραφικά μέσα δεν παρουσιάζουν από τη φύση τους σημαντική τοξικότητα. Ωστόσο, εφόσον καταλήγουν στα λύματα, δέχονται την ίδια επεξεργασία με το σύνολο των αποβλήτων. Από αυτές τις διεργασίες, προκύπτουν πολύ τοξικά παραπροϊόντα. Καθώς τα περισσότερα ιωδιούχα σκιαγραφικά μέσα έχουν μια αμινομάδα στη μοριακή τους δομή, η παραγωγή ορισμένων αζωτούχων υποπροϊόντων, όπως το αλογονοακετονιτρίλιο και τα αλογονοακεταμίδια είναι ιδιαίτερα προβληματική, λόγω της τοξικότητάς τους [101]. Άλλες τέτοιες ενώσεις είναι τα τριαλομεθάνια, το ιωδοοξικό οξύ και άλλα προϊόντα που προέρχονται από την αντίδραση του ρύπου με χλωροαμίνες. Αυτές οι ενώσεις είναι εξαιρετικά τοξικές τόσο σε κυτταροτοξικό, όσο σε γονοτοξικό επίπεδο [102, 103].

2.2. Ανάπτυξη ανοσίας στα αντιβιοτικά.

Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της πενικιλίνης. Την περίοδο που εφευρέθηκε αποτέλεσε το σημαντικότερο όπλο της ιατρικής απέναντι σε παθογόνα, όπως το στελέχος *Staphylococcus aureus*, που στοίχιζε τη ζωή σε εκατοντάδες χιλιάδες Ευρωπαίους στα μέσα του 20^{ου} αιώνα [104]. Έκτοτε, χρειάστηκαν μόλις μερικά χρόνια για να αναπτυχθεί μια φαρμακοβιομηχανία, γύρω από τα αντιβιοτικά, που θα αποτελούσαν τα θεμέλια της θεραπείας μολυσματικών ασθενειών [105].

Παρά την θεαματική πτώση των ποσοστών θνησιμότητας από τέτοιες ασθένειες, η χρήση αντιβιοτικών είχε ένα πολύ μεγάλο τίμημα. Ήδη από το 1947, μόλις 18 χρόνια από την ανακάλυψη της πενικιλίνης, παρατηρήθηκαν περιπτώσεις στελεχών του γένους *Staphylococcus* που παρουσίαζαν ανοσία στο αντιβιοτικό [106]. Σήμερα, η ανάπτυξη ανοσίας από τους παθογόνους μικροοργανισμούς αποτελεί μία από τις σοβαρότερες απειλές για τη δημόσια υγεία. Το 2009, το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και

Ελέγχου Νοσημάτων εκτιμούσε ότι κάθε χρόνο, 25.000 άνθρωποι στην Ευρώπη έχαναν τη ζωή τους από λοιμώξεις, που οφείλονταν σε βακτήρια με ανθεκτικότητα στα φάρμακα [107]. Την ίδια περίοδο, οι βρετανικές υπηρεσίες υγείας εκτιμούσαν πως η παγκόσμια θνησιμότητα από τα ίδια αίτια ανερχόταν σε μισό εκατομμύριο ανθρώπους [108]. Σήμερα, γίνονται διαρκείς εκκλήσεις, από αρμόδιες αρχές, για άμεσο περιορισμό της χρήσης αντιβιοτικών, καθώς οι ρυθμοί ανάπτυξης ανοσίας υπερβαίνουν τις τεχνικές και οικονομικές δυνατότητες της πλειονηφίας των κρατών. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός πως οι ΗΠΑ, δαπανούν σε ετήσια βάση τουλάχιστον 35 δισεκατομμύρια δολάρια του προϋπολογισμού τους, για την περίθαλψη ασθενών που μολύνονται από βακτήρια με ανεπτυγμένη ανοσία [109–111].

Η ανάπτυξη ανοσίας επιτυγχάνεται συνήθως μέσω σχετικών γονιδίων, που αποκτώνται με διάφορους μηχανισμούς. Η απόκτηση αυτών των γονιδίων είναι δυνατή με διάφορους τρόπους, καθώς τα βακτήρια διαθέτουν πολλαπλούς τρόπους για μεταφέρουν και να λαμβάνουν γενετικό υλικό. Αναφορικά, μερικές περιπτώσεις είναι: ο μετασχηματισμός, η μεταφορά και η σύζευξη (που συνήθως ονομάζονται «Οριζόντια Μεταφορά Γονιδίων» - HGT) [112]. Η διατήρηση του νεοαποκτηθέντος γενετικού υλικού μπορεί να είναι προσωρινή, αλλά και μόνιμη. Η μετάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας, με μεταφορά πλασμιδίου, είναι η πιο κοινή οδός για την απόκτηση τέτοιου γενετικού υλικού [113, 114]. Μία άλλη περίπτωση που αναφέρεται στη βιβλιογραφία είναι η μετάδοση γενετικού υλικού από βακτηριοφάγους, όμως είναι αρκετά σπάνιο να οδηγήσει σε βελτίωση του στελέχους και την ανάπτυξη ανοσίας σε αντιβιοτικά [115]. Ορισμένα βακτήρια, όπως το *Acinetobacter spp.*, είναι από τη φύση τους ικανά να αποκτούν γενετικό υλικό απευθείας από το εξωτερικό περιβάλλον [116].

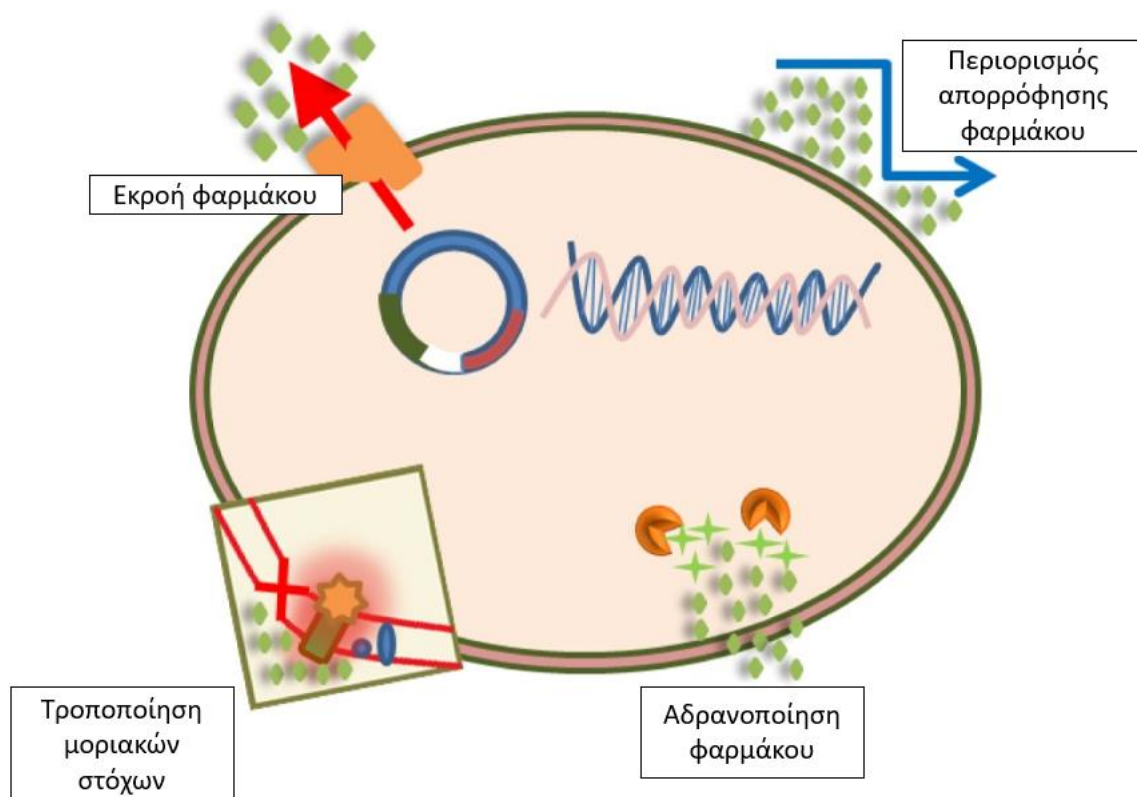
Επιπλέον, ένας τρόπος για να αποκτήσουν ανοσία τα βακτηριακά στελέχη, είναι οι μεταλλάξεις του χρωμοσωμικού τους DNA. Οι αλληλουχίες εισαγωγής και οι ιντεγκρίνες μπορεί να μετακινούν γενετικό υλικό εντός του εσωτερικού του κυττάρου, ενώ οι στρεσογόνοι παράγοντες στα βακτήρια (ασιτία, ακτινοβολία UV, χημικές ουσίες, κ.λπ.) είναι κοινές αιτίες γενετικών μεταλλάξεων διαφόρων τύπων (υποκαταστάσεις, διαγραφές κ.λπ.). Τα βακτήρια έχουν γρήγορο ρυθμό μεταλλάξεων, που αναφέρεται στη 1 μετάλλαξη για κάθε 109 κυτταρικές διαιρέσεις. Εκτός της μεγάλης συχνότητας, οι μεταλλάξεις αυτές είναι ιδιαίτερα επιδραστικές, καθώς λόγω της μεγάλης γονιδιακής πυκνότητας του βακτηριακού γενετικού υλικού, συμβαίνουν συχνά σε περιοχές γονιδίων και οδηγούν σε αρνητικές επιπτώσεις [117]. Οι μεταλλάξεις που βοηθούν στην ανάπτυξη αντοχής σε αντιβιοτικά εμφανίζονται συνήθως σε συγκεκριμένους τύπους γονιδίων, όπως εκείνοι που κωδικοποιούν στόχους, μεταφορείς, ρυθμιστές μεταφορέων φαρμάκων, ένζυμα που δρουν σε μεταβολικές οδούς που παρεμβαίνουν τα αντιβιοτικά [118]. Τέλος, πολλές μεταλλάξεις στις οποίες οφείλεται η ανάπτυξη αντοχής σε αντιβιοτικά, μπορούν να οδηγήσουν και σε εξελικτικό μειονέκτημα για τον οργανισμό. Αυτό παρατηρείται, για παράδειγμα, στην περίπτωση του *Staphylococcus aureus*, που τέτοιου είδους μεταλλάξεις μειώνουν σημαντικά το ρυθμό ανάπτυξης του στελέχους [119].

Οι μηχανισμοί αντιμικροβιακής αντοχής εμπίπτουν σε τέσσερις κύριες κατηγορίες (**Εικόνα 2.2**):

- Περιορισμός της απορρόφησης φαρμάκου.
- Τροποποίηση μοριακών στόχων ενός φαρμάκου.
- Αδρανοποίηση φαρμάκου.
- Εκροή ενεργού φαρμάκου.

Η ενδογενής αντίσταση μπορεί να κάνει χρήση του περιορισμού της πρόσληψης, της αδρανοποίησης του φαρμάκου και της εκροής φαρμάκων. Οι μηχανισμοί επίκτητης αντοχής που χρησιμοποιούνται

μπορεί να είναι η τροποποίηση στόχου φαρμάκου, η απενεργοποίηση φαρμάκου και η εκροή φαρμάκων [120, 121].



Εικόνα 2.2. Μηχανισμοί αντίστασης στην αντιβιοτική δράση [63].

Σε αυτό το σημείο, σημαντικό είναι να αναφερθεί πως τα βακτήρια χωρίζονται σε 2 κατηγορίες, με βάση το είδος της εξωτερικής μεμβράνης τους: Τα Gram-θετικά και τα Gram-αρνητικά. Τα Gram-αρνητικά βακτήρια περιβάλλονται από ένα λεπτό κυτταρικό τοίχωμα πεπτιδογλυκάνης, το οποίο το ίδιο περιβάλλεται από μια εξωτερική μεμβράνη, που περιέχει λιποπολυσακχαρίτη. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια στερούνται εξωτερικής μεμβράνης, αλλά περιβάλλονται από στρώματα πεπτιδογλυκάνης πολλές φορές παχύτερες από ό,τι βρίσκεται στα Gram-αρνητικά [122].

2.2.1. Περιορισμός της απορρόφησης φαρμάκου.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ένας από τους μηχανισμούς αντίστασης των βακτηρίων στα αντιβιοτικά βασίζεται στην ικανότητα τους να περιορίζουν την πρόσληψη ενεργών ουσιών ενός φαρμάκου, μέσω ενός μηχανισμού που εξελίσσεται με επίκεντρο το κυτταρικό τοίχωμα.

Μία περίπτωση που συναντάται ευραίως είναι αυτή των βακτηρίων που διαθέτουν εξωτερική μεμβράνη (κυρίως συναντάται σε Gram-αρνητικά στελέχη). Η δομή και ο τρόπος λειτουργίας αυτής της μεμβράνης λιποπολυσακχαριτών παρέχει προστασία εμποδίζοντας την είσοδο ορισμένων μορίων. Τέτοια μόρια μπορούν να είναι και τα αντιβιοτικά, με αποτέλεσμα η ιδιότητα αυτή να τους προσδίδει ανοσία. [123]. Συγκεκριμένα, ένα ενδιαφέρον μηχανισμός συναντάται στις περιπτώσεις όπως αυτή των μυκοβακτηρίων, που επειδή περιβάλλονται από μία μεμβράνη, αποτελούμενη σε μεγάλο βαθμό από λιπίδια, βασίζουν την αντίσταση τους γύρω από την υδροφιλικότητα της εξωτερικής τους επιφάνειας. Τα υδρόφοβα φάρμακα, όπως η ριφαμπικίνη, μπορούν να εισέλθουν ευκολότερα μέσα στο κύτταρο, σε αντίθεση με άλλα υδρόφιλα φαρμακευτικά είδη, που εμποδίζονται από τη μεμβράνη [124].

Τα Gram-θετικά βακτήρια δεν διαθέτουν πάντα μία τέτοια εξωτερική μεμβράνη, με αποτέλεσμα να αναπτύσσουν πολύ πιο σύνθετους μηχανισμούς αντίστασης. Για παράδειγμα τα στελέχη του γένους *Enterococcus* αναπτύσσουν κυτταρικό τοίχωμα που εμποδίζει την είσοδο των πολικών μορίων, προσδίδοντάς τους αντίσταση σε πολικές φαρμακευτικές ενώσεις. Ένα άλλο Gram-θετικό βακτήριο, ο *Staphylococcus aureus*, εμφανίζει 2 κύριους μηχανισμούς αντίστασης κατά της βανκομυκίνης. Οι μηχανισμοί αυτοί δεν είναι πλήρως κατανοητοί, ωστόσο στην βιβλιογραφία αναφέρεται πως παρατηρείται πως αυτά τα βακτήρια παράγουν ένα παχύρρευστο στρώμα πάνω στο κυτταρικό τους τοίχωμα που τα προστατεύει από την είσοδο ενώσεων, όπως αυτές των αντιβιοτικών [124, 125].

Γενικότερα στα βακτήρια, οι διάφορες ουσίες που χρειάζονται από το εξωτερικό περιβάλλον τους εισέρχονται στο κύτταρο μέσω των πόρων της εξωτερικής μεμβράνης τους, που λειτουργούν σαν διάλυτοι μεταφορές υλικών. Στα Gram-αρνητικά στελέχη, τα κανάλια αυτά επιτρέπουν γενικά την πρόσβαση σε υδρόφιλες ενώσεις [126]. Έτσι, αναπτύσσονται μηχανισμοί με τους οποίους, κατόπιν κατάλληλων αλλαγών σε αυτούς τους πόρους, περιορίζεται η πρόσληψη ενός φαρμάκου. Ένας μηχανισμός στηρίζεται στην μείωση του αριθμού αυτών των καναλιών (όπως συμβαίνει στα στελέχη του γένους *Enterobacteriaceae*, προσδίδοντάς τους αντίσταση κατά των καρβαπενεμών [127]). Μία δεύτερη περίπτωση αφορά τις μεταλλάξεις, που αλλάζουν την επιλεκτικότητα τέτοιων καναλιών (όπως στη *Neisseria gonorrhoeae* που γίνεται ανθεκτική στις β-λακτάμες και στην τετρακυκλίνη [126]) [128].

Ένας από τους σημαντικότερους και πιο συχνά αναφερόμενους μηχανισμούς αντίστασης είναι αυτός της ανάπτυξης ενός «βιοφίλμ», που περικλύει μια ολόκληρη βακτηριακή αποικία. Αυτές οι δομές μπορούν να αποτελούνται είτε από ένα αυτόνομο είδος βακτηρίων, είτε από μία ποικιλία διαφορετικών ειδών, που λειτουργώντας συνεργιστικά, αναπτύσσουν αντοχή σε αντιβιοτικά. Για παράδειγμα, στους παθογόνους οργανισμούς, ο σχηματισμός τέτοιων δομών προσδίδει προστασία από τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, εκτός από τα αντιβιοτικά. Η παχιά, κολλώδης σύσταση αυτού του υλικού, που αποτελείται επί τω πλείστον από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και DNA, εμποδίζει την είσοδο των φαρμακευτικών ενώσεων, προστατεύοντας τα στελέχη του εσωτερικού του. Μια σημαντική παρατήρηση που εντοπίζεται στη βιβλιογραφία σχετικά με τα βιοφίλμ, είναι ότι γενετικοί μηχανισμοί, όπως η οριζόντια μεταφορά γονιδίων, φαίνεται πως ευνοούνται, λόγω της εγγύτητας των βακτηριακών κυττάρων. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η κοινή χρήση γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά, είναι ευνοείται δυναμικά τέτοιες βακτηριακές αποικίες [129, 130].

Τέλος, τα βακτήρια που δεν διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα, είναι ανθεκτικά σε όλα τα φάρμακα που το στοχεύουν, όπως για παράδειγμα οι β-λακτάμες και τα γλυκοπεπτίδια [131].

2.2.2. Τροποποίηση μοριακών στόχων ενός φαρμάκου.

Στο σώμα ενός βακτηριακού κυττάρου, υπάρχουν πολλά συστατικά που θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχο των διάφορων αντιβιοτικών ουσιών. Πολλοί από αυτούς τους στόχους μπορούν να τους τροποποιήσουν τα ίδια τα βακτήρια, καθιστώντας δυνατή την ανάπτυξη ανθεκτικότητας, απέναντι σε αυτά τα φάρμακα.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ένας μηχανισμός, μέσω του οποίου αλλοιώνεται ο αριθμός και η δομή των πρωτεϊνών που δεσμεύουν φάρμακα όπως η πενικιλίνη. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να αναπτυχθεί ισχυρή αντίσταση, καθώς φάρμακα που λειτουργούν στοχεύοντας αυτές τις πρωτεΐνες, να μην λειτουργούν. Αυτό έχει αναφερθεί αρκετά σε φάρμακα β-λακτάμης. Αξίζει να αναφερθεί πως αυτός ο μηχανισμός παρατηρείται σχεδόν αποκλειστικά στα Gram-θετικά βακτήρια, καθώς έχουν τη δυνατότητα να τροποποιούν πρωτεΐνες όπως οι τρανσπεπτιδάσες, που εμπλέκονται στην κατασκευή του κυτταρικού τοιχώματος. Με αύξηση στον αριθμό των πρωτεϊνών αυτών, επηρεάζεται η ποσότητα του φαρμάκου που μπορεί να συνδεθεί με αυτές. Έτσι, με τέτοιες μετατροπές μπορεί ένα βακτήριο να

περιορίσει την ικανότητα πρόσδεσης ενός φαρμάκου ή ακόμα και να αναστείλει πλήρως τη δράση του [119, 132].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αντίσταση σε φάρμακα που στοχεύουν τις ριβοσωμικές υπομονάδες. Αυτός ο μηχανισμός καθίσταται εφικτός μέσω ριβοσωματικών μεταλλάξεων (που συνήθως περιλαμβάνουν γονίδια ERM), της μεθυλίωσης ριβοσωμικής υπομονάδας, ή με την επιστράτευση νουκλεασών για την προστασία των rRNAs. Αυτοί οι μηχανισμοί παρεμβαίνουν στον τρόπο με τον οποίο το φάρμακο δεσμεύεται στο ριβόσωμα και συνεπώς, περιορίζουν τη δράση του [133–135].

Μεταξύ άλλων, έχουν αναπτυχθεί και μηχανισμοί κατά φαρμάκων που παρεμποδίζουν τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων, όπως οι φθοροκινολόνες. Αυτού του είδους η αντίσταση επιτυγχάνεται μέσω αλλαγής της δομής της γυράσης του DNA και συναντάται κυρίως σε Gram-αρνητικά στελέχη. Από την άλλη, τα Gram-θετικά βακτήρια τροποποιούν την τοποϊσομεράση IV, για τον ίδιο σκοπό. Αυτοί οι μηχανισμοί ενεργοποιούνται επί τω πλείστον από μεταλλάξεις [136].

Ένας από τους πιο διαδεδομένους τρόπους δράσης των αντιβιοτικών είναι η αναστολή μεταβολικών οδών. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η αντίσταση επιτυγχάνεται μέσω μεταλλάξεων στα ένζυμα που εμπλέκονται σε αυτές. Η πιο συχνά αναφερόμενη περίπτωση είναι αυτή που αφορά τη βιοσύνθεση του φολικού οξέος. Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1, σε αυτόν τον μηχανισμό παρεμβαίνουν η Σουλφαδοξίνη και γενικά τα σουλφοναμίδια, με το να συνδέονται στα αντίστοιχα ένζυμα, λόγω της δομικής ομοιότητάς τους με τα φυσικά υποστρώματα του βακτηρίου. Η δράση αυτή χαρακτηρίζεται ως ανταγωνιστική αναστολή και βασίζεται στη δέσμευση του αντιβιοτικού στην ενεργό θέση ενός ενζύμου. Οι μεταλλάξεις σε αυτά τα ένζυμα εντοπίζονται συχνότερα μέσα ή κοντά στην ενεργό θέση τους, με τέτοιο τρόπο, που οι δομικές αλλαγές που προκαλούνται στο ένζυμο δεν δημιουργούν προβλήματα στη φυσιολογική λειτουργία του, αλλά εμποδίζουν τη δέσμευση του φαρμάκου σε αυτό [137, 138].

2.2.3. Αδρανοποίηση φαρμάκου.

Υπάρχουν 2 τρόποι με τους οποίους ένα βακτήριο μπορεί να αδρανοποιήσει κάποιο φάρμακο. Αρχικά, μπορούν να ενεργοποιήσουν μηχανισμούς που επιτρέπουν την πραγματική αποικοδόμηση του φαρμάκου. Επιπλέον, είναι δυνατή η μεταφορά μιας χημικής ομάδας στο φάρμακο [139].

Η απενεργοποίηση ενός φαρμάκου με μεταφορά μιας χημικής ομάδας στο φάρμακο πραγματοποιείται συνήθως με μεταφορά ακετυλ- φωσφορυλ- και αδενυλ- ομάδων. Η ακετυλίωση είναι ένας μηχανισμός που παρουσιάζει μεγάλη συχνότητα και ποικιλία αποτελεσμάτων. Αναφέρεται συχνά ότι οδηγεί σε αντοχή απέναντι στις αμινογλυκοσίδες, τη χλωραμφενικόλη, τις στρεπτογραμίνες και τις φθοριοκινολόνες. Επιπλέον, αναφέρονται και περιπτώσεις φωσφορυλίωσης και αδενυλίωσης, που οδηγούν κυρίως σε αντοχή έναντι των αμινογλυκοσιδών [139–142].

2.2.4. Εκροή ενεργού φαρμάκου.

Τα βακτήρια διαθέτουν χρωμοσωμικά γονίδια που κωδικοποιούν αντλίες εκροής. Οι αντλίες εκροής είναι πρωτεΐνες μεταφοράς βακτηρίων που εμπλέκονται στην εξώθηση μορίων από το εσωτερικό του κυττάρου στο εξωτερικό περιβάλλον [143].

Ορισμένα εξ αυτών των γονιδίων εκφράζονται φυσιολογικά, ενώ άλλα υπερεκφράζονται ως μια μορφή Αντίστασης Υψηλού Επιπέδου, που συνήθως είναι αποτέλεσμα μετάλλαξης στο γονίδιο που συνδέεται με το κανάλι μεταφοράς. Η έκφραση αυτή γενικότερα, γίνεται κατόπιν ορισμένων

περιβαλλοντικών ερεθισμάτων ή όταν το βακτήριο εκφράζει από εγγενώς κατάλληλο υπόστρωμα. Οι αντλίες εκροής έχουν ως κύρια λειτουργία την απομάκρυνση τοξικών ουσιών από το εσωτερικό του κυττάρου, ενώ έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις που μία αντλία μπορεί να μεταφέρει διαφορετικές ενώσεις (Αντλίες Εκροής Πολλαπλών Φαρμάκων) [123, 144]. Έτσι, οι αντλίες αυτές αποτελούν εξ ορισμού έναν μηχανισμό άμυνας.

Τα βακτήρια διαθέτουν διάφορους τύπους αντλιών εκροής, ενώ δεν είναι απαραίτητο ένα στέλεχος να διαθέτει μόνο έναν τύπο. Οι πέντε κύριες οικογένειες αντλιών εκροής στα βακτήρια αναφέρονται παρακάτω και ταξινομούνται με βάση την πηγή ενέργειας και τη δομή τους:

- η οικογένεια κασέτας σύνδεσης ATP (ABC),
- η οικογένεια εξώθησης πολλαπλών φαρμάκων και τοξικών ενώσεων (MATE),
- η οικογένεια μικρής αντοχής σε πολλά φάρμακα (SMR),
- η κύρια υπεροικογένεια διευκολυντή (MFS)
- η οικογένεια αντίστασης-οξώδης-κυτταρικής διαίρεσης (RND).

Οι περισσότερες από αυτές τις οικογένειες αντλιών εκροής είναι αντλίες ενός συστατικού που μεταφέρουν υποστρώματα κατά μήκος της κυτταροπλάσματικής μεμβράνης.

Στα Gram-αρνητικά βακτήρια, παρατηρούνται περιπτώσεις όπου αντλίες εκροής από διαφορετικές κατηγορίες ενεργούν με άλλα κυτταρικά συστατικά, για την απομάκρυνση πολλαπλών ουσιών. Ένα μέλος της οικογένειας ABC, το MacB, συνθέει μία δομή αντλίας τριών μερών (MacAB-TolC), για την αποβολή μακρολιδικών ενώσεων. Ένα μέλος των MFS, το EmrB, συναντάται στο στέλεχος *E. coli* και σχηματίζει επίσης μια παρόμοια δομή (EmrAB-TolC) για την αποβολή του ναλιδιξικού οξέος [145, 146].

Οι αντλίες εκροής που βρίσκονται σε Gram-θετικά στελέχη κωδικοποιούνται στο χρωμόσωμα του κυττάρου. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως η ανθεκτικότητα που προσδίδουν είναι εγγενής. Αυτές οι αντλίες περιλαμβάνουν μέλη από διάφορες κατηγορίες, όπως MATE, MFS, καθώς και φθοροκινολόνες. Φυσικά, έχουν αναφερθεί και αντλίες που κωδικοποιούνται από πλασμίδια, που οδηγούν σε επίκτητη αντίσταση. Συνήθως, οι αντλίες αυτές (των Gram-θετικών βακτηρίων) ανήκουν στην κατηγορία MFS [147–149]. Οι αντλίες εκροής των Gram-αρνητικών βακτηρίων, εμφανίζουν μεγαλύτερη ποικιλία και υπάρχουν αναφορές από όλες τις παραπάνω κατηγορίες. Η σημαντικότερες περιπτώσεις ωστόσο, είναι αυτές της οικογένειας RND [150].

Η κατηγορία RND περιλαμβάνει αντλίες πολλαπλών συστατικών και συναντάται κυρίως σε Gram-αρνητικά βακτήρια. Λειτουργούν σε συνδυασμό με συγκεκριμένες πρωτεΐνες, που σχετίζονται με την εξωτερική μεμβράνη και το γενικότερο κυτταρικό περιβάλλον [151, 152].

2.3. Ρύπανση σουλφοναμίδων.

Οι σουλφοναμίδες ενώσεις αποτελούν μία σημαντική κατηγορία αντιβιοτικών, που λαμβάνει διαρκώς όλο και μεγαλύτερο πεδίο εφαρμογής. Φυσική συνέχεια της αυξανόμενης χρήσης τους είναι η ανάλογη αύξηση στη συχνότητα και τη συγκέντρωση ανίχνευσής τους στο περιβάλλον. Εφόσον χορηγηθούν σε ανθρώπους και ζώα, περίπου το 30-90% των σουλφοναμίδων καταλήγουν στα λύματα και εισέρχονται στο περιβάλλον [153, 154]. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, περισσότεροι από 20.000 τόνοι

σουλφοναμιδικών αντιβιοτικών απελευθερώνονται στη βιόσφαιρα κάθε χρόνο [153]. Αρκετές εθνικές και διεθνείς μελέτες έχουν αναφέρει την παρουσία υπολειμμάτων σουλφοναμιδίων σε διάφορα υδάτινα σώματα (συμπεριλαμβανομένων των επιφανειακών, των υπόγειων, και θαλάσσιων υδάτων).

Λόγω της αυξημένης συσσώρευσης των σουλφοναμιδικών αντιβιοτικών στο περιβάλλον, ο οικολογικός αντίκτυπός τους γίνεται όλο και πιο εμφανής. Έτσι, ορισμένοι ερευνητές μελέτησαν τον αντίκτυπο σε βακτηριακές κοινότητες οικοσυστημάτων, που αποδίδεται στην εκτεταμένης χρήσης σουλφοναμιδίων. Από σχετική μελέτη προκύπτει ότι το βακτηριακό στέλεχος *Acinetobacter* (Ακινετοβακτήριο), Gram-αρνητικό βακτήριο, εμφανίζεται με την υψηλότερη αφθονία (35%) μεταξύ των ανθεκτικών στα σουλφοναμίδια στελεχών [155], ενώ παράλληλα, έχουν εντοπιστεί και ορισμένα παθογόνα, τα οποία αναπτύσσουν ανθεκτικότητα και συνεπώς ενδέχεται να αποτελούν απειλή για την ανθρώπινη υγεία.

Μεταξύ όλων των υδρόβιων οργανισμών, τα φύκια είναι από τα πιο ευαίσθητα είδη στα σουλφοναμιδικά αντιβιοτικά [156]. Ωστόσο, επειδή αποτελούν τη βάση της υδάτινης τροφικής αλυσίδας [157], η μείωση του πληθυσμού τους επηρεάζει άμεσα την ισορροπία ολόκληρου του υδάτινου οικοσυστήματος [89]. Ο μηχανισμός τοξικότητας των σουλφοναμιδίων στα φυτά είναι παρόμοιος με αυτόν της αναστολής της βακτηριακής δραστηριότητας, επηρεάζοντας την ανάπτυξη των φυτών μέσω της αναστολής της δραστηριότητας της διϋδροφολικής συνθάσης [158].

Επίσης, οι σουλφοναμιδικές ενώσεις μπορούν να εμφανίσουν τοξικότητα και για υδρόβια ζώα. Τα ψάρια παράγουν ορισμένα ηλεκτροφιλικά ενδιάμεσα κατά το μεταβολισμό των αντιβιοτικών, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στην αντιοξειδωτική ενζυμική δραστηριότητα τους, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες [159]. Όταν είδη ψαριών καλλιεργήθηκαν σε περιβάλλον με σουλφοναμίδια (εντός εργαστηρίου) σε συγκέντρωση πολύ υψηλότερη από αυτή που συναντάται στο περιβάλλον, παρατηρήθηκαν εμφανείς τερατογόνες και θανατηφόρες επιδράσεις [160]. Για παράδειγμα, όταν ερευνητές εξέθεσαν το ψάρι ζέβρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σουλφοναμιδίων, παρατήρησαν σημαντικές διαφορές στις αρνητικές επιπτώσεις των διαφορετικών ειδών αντιβιοτικών στα συγκεκριμένα υδρόβια ζώα, που μετά από ένα όριο συγκεντρώσεων οδηγούσαν σε θάνατο του πληθυσμού [161]. Γενικά, τα αντιβιοτικά σουλφοναμιδίων ασκούν αθροιστική επίδραση στα ψάρια. Για παράδειγμα, σε σχετική έρευνα μελετήθηκε ο εμπλουτισμός σουλφαμεθαζίνης και σουλφαμεθοξαζόλης σε ψάρια τύπου ζέβρα και διαπίστωσε ότι η τιμή του μέγιστου παράγοντα βιοσυγκέντρωσης (BCF) των ψαριών για τη σουλφαμεθαζίνη και τη σουλφαμεθοξαζόλη αυξανόταν σημαντικά στις περιπτώσεις συνύπαρξης των 2 αντιβιοτικών. Η τιμή BCF αντιπροσωπεύει την αναλογία της περιεκτικότητας ενός φαρμάκου στα ψάρια (mg/kg), προς την περιεκτικότητά του στο νερό (mg/L). Με αυτόν τον τρόπο εκφράζεται ο βαθμός εμπλουτισμού των φαρμάκων στα ψάρια [162].

Οι σουλφοναμίδες μπορούν εύκολα να συσσωρευτούν και σε άλλους οργανισμούς, εκτός από τα ψάρια. Σε σχετική έρευνα, αναλύθηκαν 304 δείγματα κρέατος και βρέθηκαν υπολείμματα σουλφοναμιδίων σε 46 από αυτά. Η συγκέντρωση που ανιχνεύθηκε σε δείγματα κοτόπουλου και βοείου κρέατος ήταν σε πολύ υψηλά επίπεδα, που υπερβαίνουν σημαντικά το όριο συγκέντρωσης που καθορίζεται στην Ευρώπη [163].

2.4. Ρύπανση από προϊόντα μετασχηματισμού (TPs).

2.4.1. Επιπτώσεις προϊόντων μετασχηματισμού στο περιβάλλον

Αν και μέχρι σήμερα οι περισσότερες περιβαλλοντικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ανίχνευση μητρικών ενώσεων φαρμακευτικών προϊόντων, πληθαίνουν σημαντικά οι αναφορές που υποδηλώνουν ότι τα προϊόντα διάσπασής τους μπορούν να φτάσουν σε παρόμοια ή ακόμη υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης στο περιβάλλον [164].

Όπως αναφέρεται λεπτομερώς σε παρακάτω κεφάλαιο, τα λύματα δεν απελευθερώνονται στο περιβάλλον χωρίς επεξεργασία. Μάλιστα, σε πολλές μονάδες διαχείρισης αποβλήτων εφαρμόζονται επιπλέον διεργασίες οξείδωσης, για την διάσπαση ανθεκτικών ρύπων. Ωστόσο, η ανοργανοποίηση είναι σπάνια και στις περισσότερες περιπτώσεις απελευθερώνονται στο περιβάλλον οργανικές ενώσεις, που αποτελούν προϊόντα διάσπασης του φαρμακευτικού ρύπου.

Αυτές οι ενώσεις τείνουν να εμφανίζουν ασθενέστερη αντιβιοτική δράση και τοξικότητα σε σχέση με το μητρικό μόριο, ωστόσο αυτό δεν τηρείται σε όλες τις περιπτώσεις [165]. Αυτό έχει εγείρει σημαντικό προβληματισμό στην επιστημονική κοινότητα και τους διεθνείς οργανισμούς, που σχετίζονται με την λήψη αποφάσεων περιβαλλοντικού χαρακτήρα. Η Ευρωπαϊκή Ένωση, μέσω της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (Commission) έχει θεσμοθετήσει ανώτατα όρια, που δεν εφαρμόζονται μόνο σε μητρικές φαρμακευτικές ουσίες, αλλά και σε προϊόντα διάσπασης και μεταβολισμού, αναγνωρίζοντάς τα επίσημα ως «αναδυόμενους ρύπους» [166].

Υπάρχουν πολλές πιθανές εξηγήσεις για το ότι ένα προϊόν μετασχηματισμού είναι πιο τοξικό από τη μητρική του ένωση:

- Αρχικά, το ενεργό τμήμα της μητρικής ένωσης μπορεί να εξακολουθεί να υπάρχει στο προϊόν μετασχηματισμού και επομένως αυτό να εμφανίζει τον ίδιο τοξικό χαρακτήρα με το μητρικό.
- Επίσης, ο μετασχηματισμός ενός ρύπου μπορεί να δημιουργήσει προϊόντα που εμφανίζουν υψηλότερο συντελεστή βιοσυγκέντρωσης από τη μητρική ένωση. Έτσι, περισσότεροι ρύποι θα λειτουργούν στο σημείο δράσης, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται εντονότερες επιπτώσεις ρύπανσης. Αυτός είναι ένας βασικός παράγοντας που επηρεάζει την οικοτοξικότητα των ενώσεων, που δρουν μέσω παρόμοιου τρόπου δράσης [167].
- Συχνά, εμφανίζονται περιπτώσεις που η οδός μετασχηματισμού οδηγεί σε ένα προϊόν με διαφορετικό και πιο ισχυρό τρόπο δράσης από τη μητρική ένωση.
- Τέλος, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις που η εφαρμοζόμενη ουσία έχει σχεδιαστεί για να απορροφάται από έναν οργανισμό και μόλις απορροφηθεί μεταβολίζεται σε δραστική ουσία που προκαλεί το επιθυμητό αποτέλεσμα. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως το προϊόν μετασχηματισμού είναι το ίδιο το δραστικό συστατικό. Αυτός ο μηχανισμός παρατηρείται περισσότερο σε περιπτώσεις φυτοφαρμάκων, ωστόσο είναι εφικτός και σε συστήματα που αφορούν τη φαρμακευτική δράση [168].

Σε έρευνα του 2019 είχαν καταγραφεί 66 προϊόντα οξείδωσης φαρμακευτικών ρύπων στα ευρωπαϊκά επιφανειακά ύδατα [169]. Αυτά τα δεδομένα ερχόταν να συμπληρώσουν μελέτες που ανεδείκνυν πως έως και το 20% των πρόσφατα καταγεγραμμένων αναδυόμενων ρύπων στα ύδατα του Ηνωμένου Βασιλείου είναι προϊόντα μεταβολισμού [170]. Ωστόσο, πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι ακόμη και αυτές οι εκτιμήσεις απέχουν σημαντικά από την πραγματική εικόνα. Γενικότερα, η ύπαρξη των προϊόντων οξείδωσης στα οικοσυστήματα και τα υδάτινα σώματα δεν μπορεί να μελετηθεί εύκολα και σε αυτό οφείλεται το μεγαλύτερο μέρος του υφιστάμενου προβληματισμού, γύρω από το συγκεκριμένο

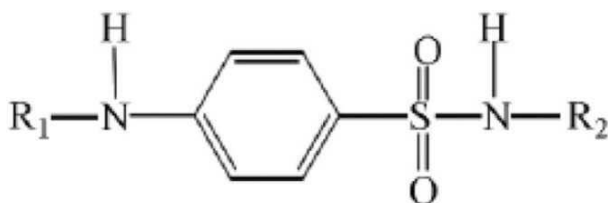
θέμα. Η γνώση σχετικά με την εμφάνιση και τη συμπεριφορά των ενώσεων αυτών είναι ελλιπής ή ανύπαρκτη για διάφορους λόγους [171]:

- Δεν υπάρχουν διαθέσιμα υλικά αναφοράς για τα προϊόντα μετασχηματισμού.
- Δεν υπάρχουν αρκετές αναλυτικές μέθοδοι.
- Αρκετά από τα προϊόντα μετασχηματισμού είναι άγνωστα, καθώς τα δεδομένα καταχώρισης τους δεν είναι εύκολα προσβάσιμα ή δεν είναι γενικά διαθέσιμα.
- Πολλά προϊόντα μετασχηματισμού είναι χημικά είδη, με παροδικό χρόνο ζωής. Έτσι, μπορεί να υπάρχουν μόνο για μερικά δευτερόλεπτα ή λεπτά. Πρακτικά, αυτό σημαίνει πως μόνο προϊόντα μετασχηματισμού, με σχετικά μεγάλο χρόνο ημιζωής σε υδάτινα περιβάλλοντα (συνήθως περισσότερο από ημέρες), μπορούν να απομονωθούν και να ανιχνευθούν.

2.4.2. Προϊόντα μετασχηματισμού σουλφοναμιδικών ενώσεων.

Τα προϊόντα μετασχηματισμού των σουλφοναμιδίων έχουν εγείρει αυξανόμενη ανησυχία για το περιβάλλον και την υγεία, αλλά οι πληροφορίες σχετικά με την ανάλυσή τους και την περιβαλλοντική μοίρα παραμένουν περιορισμένες.

Τα σουλφοναμίδια είναι τα παράγωγα της αμμωνιακής βενζολοσουλφονικής ομάδας και οι μοριακές τους δομές αποτελούνται από έναν δακτύλιο βενζολίου, μια παρα-αμινο ομάδα και μια ομάδα σουλφονφθαλαμιδίου (**Εικόνα 2.3**). Οι ενώσεις αυτές έχουν διαφορετικές ιδιότητες και λειτουργίες λόγω των διαφορετικών -R ομάδων τους και η πολικότητα τους αλλάζει υπό διαφορετικές συνθήκες και τιμές pH. Με εξαίρεση περιπτώσεις όπως η σουλφαγουανιδίνη και η σουλφασαλαζίνη, είναι γενικά υδατοδιαλυτά μόρια και έχουν χαμηλή σταθερά Henry. Επιπλέον, μπορούν να απορροφηθούν ελαφρώς από το έδαφος, γεγονός που διευκολύνει την διάχυσή τους στο περιβάλλον [161].



Εικόνα 2.3. Γενική δομή ενός σουλφοναμιδίου [161].

Οι διαφορές στο επίπεδο τοξικότητας των σουλφοναμιδίων μπορεί να σχετίζονται με τη μοριακή τους δομή και ειδικότερα με το ενεργό μέρος του μορίου. Για παράδειγμα, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός ανθράκων στην πλευρική ομάδα R, τόσο μικρότερη είναι η τοξικότητα.

Από τα προϊόντα μετασχηματισμού των σουλφοναμιδίων, πολλές ανησυχίες συγκεντρώνονται γύρω από τις περιπτώσεις ακετυλιομένων ενώσεων. Αυτοί οι μεταβολίτες αποτελούν από τα κυριότερα είδη, που ανιχνεύονται μαζί με μητρικά σουλφοναμίδια, σε υδάτινα περιβάλλοντα [172]. Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει η σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ μητρικών μορίων και προϊόντων μετασχηματισμού. Συγκεκριμένα, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις αλληλομετατροπής μεταξύ σουλφοναμιδίων και ακετυλιομένων προϊόντων σε διεργασίες επεξεργασίας λυμάτων [173]. Σε σχετική μελέτη, παρουσιάζονται μειούμενα ποσοστά ακετυλοσουλφοναμιδίων, συγκριτικά με αυτά των μητρικών ενώσεων, υποδηλώνοντας ότι τα προϊόντα μετασχηματισμού μπορούν να μετατραπούν αργά σε μεγαλύτερα σουλφοναμίδια, όταν παραμένουν σε φυσικά υδάτινα σώματα [174, 175]. Εκτός από την ακετυλίωση, τα σουλφοναμιδικά αντιβιοτικά υφίστανται υδροξυλίωση και σύζευξη

γλυκουρονιδίου [176]. Αυτοί οι μεταβολίτες απεκκρίνονται παράλληλα με τα ακετυλιομένα προϊόντα στα υδάτινα σώματα, ωστόσο, υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες για τη δράση τους [177].

3. Προηγμένες Οξειδωτικές Μέθοδοι Αντιρρύπανσης

Η αυξανόμενη χρήση αντιβιοτικών έχει οδηγήσει σε αντίστοιχη κλιμάκωση του κινδύνου περιβαλλοντικής μόλυνσης κατά την απελευθέρωσή τους σε αυτό, υπό τη μορφή αποβλήτων. Όπως τεκμηριώθηκε παραπάνω, οι συνέπειες της ανεξέλεγκτης παρουσίας όλων αυτών των χημικών σκευασμάτων στα απόβλητα και τα αστικά λύματα θα μπορούσε να λάβει διαστάσεις υγειονομικής κρίσης. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει δείξει τον έντονο προβληματισμό του, αναφορικά με το εν λόγω ζήτημα, μέσω πολλαπλών μελετών γύρω από τα μοτίβα κατανάλωσης αντιβιοτικών [178]. Σε επίσημη δήλωση τύπου που πραγματοποίησε ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας τον Μάρτιο του 2022 [179], τονίζεται πως πρέπει να ληφθούν κρατικές πρωτοβουλίες για την αντιμετώπιση του φαινομένου, οι οποίες θα περιλαμβάνουν τον έλεγχο στη λήψη φαρμακευτικών σκευασμάτων απουσία γνωμοδότησης από επαγγελματία υγείας.

Ωστόσο, η εφαρμογή τέτοιων πολιτικών, που έχουν ως επίκεντρο τον περιορισμό της άσκοπης χρήσης αντιβιοτικών, δεν θα μπορούσε να λύσει μονομερώς το πρόβλημα. Τα ανθρωπογενή απόβλητα αυξάνονται εκθετικά στα σύγχρονα αστικά κέντρα, οδηγώντας σε ανάλογη πίεση των επί μέρους οικοσυστημάτων, λόγω της εναπόθεσης ρύπων και αντιβιοτικών ουσιών που προέρχονται από την καθημερινή ανθρώπινη δραστηριότητα. Συγκεκριμένα, εκτιμάται ότι μέχρι το 2050, τα ανθρωπογενή απόβλητα σε παγκόσμια βάση θα αυξηθούν κατά τουλάχιστον 70%, φτάνοντας τους 3 δισεκατομμύρια τόνους ετησίως [180].

Συνεπώς, η δεδομένη ύπαρξη τέτοιου περιεχομένου στα αστικά λύματα έχει καταστήσει ως επιτακτική ανάγκη την επεξεργασία τους, προκειμένου να διασφαλιστεί η περιβαλλοντική υγιεινή κατά την εναπόθεση τους στο περιβάλλον. Αυτό γίνεται εφικτό με τη χρήση Προηγμένων Οξειδωτικών Μεθόδων Αντιρρύπανσης – ΠΟΜΑ (Advanced Oxidation Processes – AOPs). Παράλληλα, τέτοιες μέθοδοι διαχείρισης αποβλήτων ενισχύουν σημαντικά τις προοπτικές ανάπτυξης νέων πυλώνων κυκλικής οικονομίας, γύρω από το χώρο των αστικών αποβλήτων [181].

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4.1**, οι ΠΟΜΑ αποτελούνται από ένα ευρύ φάσμα μεθόδων, που εμπλουτίζονται διαρκώς με νέες ιδέες και καινοτομίες. Οι βασικότερες κατηγορίες είναι αυτές της φωτόλυσης, όζοντος, υπεροξειδίου του υδρογόνου, ετερογενούς φωτοκατάλυσης, ηλεκτροχημικής οξείδωσης και ηχοχημικής οξείδωσης [182–189].

Βασικό χαρακτηριστικό βάσει του οποίου κατηγοριοποιούνται είναι ο μηχανισμός οξείδωσης, δηλαδή του είδους των οξειδωτικών μέσω που παράγονται, καθώς και του τρόπου σύνθεσής τους. Τα οξειδωτικά μέσα συνήθως είναι φορτισμένες ρίζες, με κυριότερη αυτή του $\text{OH}\cdot$. Οι ρίζες αυτές είναι εξαιρετικά δραστικές και εμφανίζουν χαμηλή εκλεκτικότητα, με αποτέλεσμα να αντιδρούν ταχύτατα με το συνολικό οργανικό περιεχόμενο ενός αποβλήτου. Σε ένα τέτοιο σύστημα, ο συνδυασμός πολλαπλών μηχανισμών και αντιδράσεων είναι περίπλοκος και δεν μπορεί εύκολα να μελετηθεί. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων αυτές οι ρίζες διασπούν οργανικά μόρια είναι πολλαπλοί. Σε γενικές γραμμές καθορίζονται από τη φύση και τις ιδιότητες του μορίου. Η απόσπαση υδρογόνου και η προσθήκη σε διπλό δεσμό $\text{C}=\text{C}$ είναι από τις κυριότερες αντιδράσεις αποικοδόμησης. Κατά την απομάκρυνση ενός υδρογόνου από το μόριο, δημιουργούνται οργανικές ρίζες $\text{R}\cdot$. Με τη σειρά τους αυτές, αντιδρούν στιγμιαία με διαθέσιμο διαλυμένο O_2 του διαλύματος, παράγοντας οργανικές ρίζες υπεροξειδίου $\text{RO}_2\cdot$ [190–192]. Αυτές οι ρίζες είναι πολύ ασταθείς, με αποτέλεσμα να διασπώνται ταχύτατα μέσω διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, προκαλώντας την παραγωγή διαφορετικών προϊόντων οξείδωσης του αρχικού μορίου, αλλά και H_2O_2 , ως υποπροϊόν [193].

Πίνακας 3.1. Κατηγορίες ΠΟΜΑ.

Κατηγορία μεθόδου	Πηγή οξειδωτικού μέσου
Φωτόλυση	Ακτινοβολία UV
Διεργασίες με βάση το όζον	O ₃ , O ₃ /UV, O ₃ /H ₂ O ₂ , O ₃ /H ₂ O ₂ /UV
Διεργασίες με βάση το υπεροξείδιο του υδρογόνου	H ₂ O ₂ /UV, H ₂ O ₂ /Fe ²⁺ (Fenton), H ₂ O ₂ /Fe ³⁺ (Fenton-like), H ₂ O ₂ /Fe ²⁺ /UV (Photo-Fenton)
Ετερογενής φωτοκατάλυση	TiO ₂ /UV TiO ₂ /UV/H ₂ O ₂
Ηλεκτροχημική οξείδωση	Ηλεκτρόλυση νερού, χρήση ηλεκτρικού ρεύματος 2-20A
Ηχοχημική οξείδωση	Ηχόλυση νερού, Χρήση υπερήχων 20kHz–2MHz

Κοινό μειονέκτημα των συγκεκριμένων περιπτώσεων είναι το υψηλό κόστος λειτουργίας τους, που οφείλεται είτε στην ανάγκη ακριβού εξοπλισμού (π.χ. λάμπες UV), είτε στη χρήση ακριβών αντιδραστηρίων (π.χ. H₂O₂). Συνέπεια αυτού είναι η δυσκολία στην κλιμάκωση, που με τη σειρά της δίνει κίνητρα στους επιστήμονες για την αναζήτηση εναλλακτικών λύσεων που θα μείωναν το κόστος, διατηρώντας σταθερά τα επίπεδα απόδοσης.

3.1. Φωτόλυση με υπεριώδη ακτινοβολία.

Οι φωτολυτικές διεργασίες οξείδωσης, που χρησιμοποιούνται για την αποικοδόμηση οργανικών ρύπων, αποτελούν από τις πιο απλές περιπτώσεις ΠΟΜΑ. Βασίζονται στην παροχή ενέργειας σε χημικές ενώσεις με τη μορφή ακτινοβολίας, η οποία απορροφάται από τα μόρια, προκειμένου αυτά να φτάσουν σε διεγερμένες καταστάσεις. Όταν ένα μόριο μείνει διεγερμένο για ορισμένο χρόνο, ενεργοποιούνται μηχανισμοί που δίνουν διαφορετικές χημικές αντιδράσεις [189, 194].

Αυτές οι θερμολυτικές μέθοδοι έχουν ως οξειδωτικό μέσο την υπεριώδη ακτινοβολία λόγω της υψηλότερης ενέργειας που απορροφούν τα μόρια. Η ακτινοβολούμενη ενέργεια μεταφέρεται με τη μορφή κβαντισμένων μονάδων που ονομάζονται φωτόνια. Τα φωτόνια παρέχουν την ενέργεια που απαιτείται για να διεγερθούν συγκεκριμένα ηλεκτρόνια και να σχηματιστούν ελεύθερες ρίζες. Αυτές οι ρίζες υφίστανται μια σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων, από τις οποίες μπορούν να προκληθεί ομόλυση ασθενών δεσμών [195, 196].

Επιπλέον, με ηλεκτρονική μεταφορά από τη διεγερμένη κατάσταση του οργανικού μορίου στο διαλυμένο μοριακό οξυγόνο, μπορούν να δημιουργηθούν ρίζες υπεροξειδίου (O_2^-) ή άλλα χημικά αντιδραστήρια όπως το όζον (O_3) ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Συνήθως τέτοια αντιδραστήρια είναι εξαιρετικά ασταθή σε ένα σύστημα υδατικού διαλύματος, παρουσία υπερϊώδους ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούν μηχανισμούς που παράγουν ρίζες OH^\cdot [189].

Έτσι, η άμεση φωτόλυση περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του φωτός με τα μόρια για να προκαλέσει τη διάσπασή τους σε απλούστερα θραύσματα. Για το λόγο αυτό, σε οποιαδήποτε διαδικασία στην οποία χρησιμοποιείται η υπερϊώδης ακτινοβολία, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί φωτόλυση. Η ένταση και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας ή η κβαντική απόδοση της ένωσης που πρόκειται να οξειδωθεί είναι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση μιας τέτοιας διαδικασίας. Ως πηγή υπερϊώδους ακτινοβολίας, χρησιμοποιούνται συνήθως λαμπτήρες ατμού υδραργύρου, ενώ η πρόσφατη τεχνολογία έχει προσφέρει και τις λάμπες τύπου LED [197, 198].

Η έμμεση φωτοαποικοδόμηση οφείλεται στην οξείδωση, που προκαλείται από ρίζες που δημιουργούνται, όταν το φως διεγείρει ορισμένα μόρια, κοινώς γνωστά ως «φωτοευαισθητοποιητές». Η διαλυμένη οργανική ύλη και τα νιτρικά ιόντα είναι 2 παραδείγματα φωτοευαισθητοποιητών που βρίσκονται συνήθως σε υδατικά σώματα και απόβλητα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγή ριζών από ευαισθητοποιητές είναι μια διαδικασία που προκαλείται από το υπερϊώδες φως και, ως εκ τούτου, οδηγεί σε έμμεση φωτοαποικοδόμηση του ρύπου [198, 199].

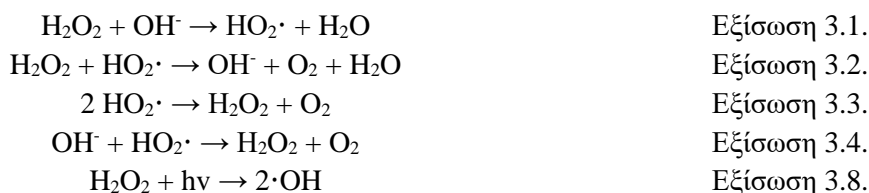
3.2. Διεργασίες με βάση το υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 .

Το H_2O_2 είναι από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια, λόγω του ότι είναι σχετικά ασφαλές και εμπορικά διαθέσιμο σε αρκετά ικανοποιητικά επίπεδα. Αυτά τα χαρακτηριστικά, ευνοούν την κλιμάκωση των διεργασιών στις οποίες χρησιμοποιείται, με αποτέλεσμα να αποτελεί μία κλασική επιλογή στις μεθόδους οξείδωσης. Ωστόσο, από μόνο του δεν μπορεί να εμφανίσει ικανοποιητική αποικοδόμηση ρύπων, με αποτέλεσμα να απαιτείται η χρήση επιπλέον παραγόντων που, λειτουργώντας συνεργιστικά, θα το ενεργοποιήσουν και θα εκκινήσουν την ΠΟΜΑ. Τέτοιοι παράγοντες είναι αντιδραστήρια (όπως το O_3), καταλύτες (όπως το Fe^{2+}) και η ακτινοβολία (όπως η UVC). Οι επιμέρους εφαρμογές δεν είναι απαραίτητο να είναι αυτόνομες, καθώς συχνά συναντώνται και περιπτώσεις που η χρήση κάποιου αντιδραστηρίου ή καταλύτη συνδυάζεται με την εφαρμογή ακτινοβολίας, όπως στην περίπτωση της photo-Fenton [182].

3.2.1. H_2O_2 /UV

Μια απλή περίπτωση ΠΟΜΑ, που βασίζεται στην παραγωγή ριζών OH^\cdot από το H_2O_2 , είναι αυτή του H_2O_2 /UV. Η αρχή της στηρίζεται στην διάσπαση του αντιδραστηρίου από την υπερϊώδη ακτινοβολία που προσδίδεται στο σύστημα. Η ακτινοβολία που δημιουργεί αυτές τις ρίζες έχει μήκος κύματος 254 nm και συνεπώς για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται λάμπες UVC (200-280 nm) [200, 201]. Γενικότερα, η ακτινοβολία αυτού του φάσματος χρησιμοποιείται συχνά ως αυτόνομη εφαρμογή, όπως θα εξηγηθεί παρακάτω. Ωστόσο, πολλές φορές αδυνατεί να ανταποκριθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις οργανικού φορτίου ή σε περιεχόμενο που δεν είναι φωτοευαίσθητο [185]. Κατά τον συνδυασμό της με το αντιδραστήριο του H_2O_2 , παράγονται ρίζες OH^\cdot , που λειτουργούν συμπληρωματικά και ενισχύουν την οξειδωτική ισχύ της μεθόδου.

Το “κλειδί” της εν λόγω μεθόδου βρίσκεται στην φωτοκαταλυτική διάσπαση του H_2O_2 , που ακολουθεί τον παρακάτω μηχανισμό [202, 203]:



Όπως παρατηρείται από τις εξισώσεις αντιδράσεων 3.1-3.4, εκτός της παραγωγής ριζών OH^\cdot , δημιουργείται εκ νέου H_2O_2 . Συγκεκριμένα, αυτό προκύπτει από τις αντιδράσεις 3.3 και 3.4, καθώς και τον απλό διμερισμό των ριζών υδροξυλίου. Αυτό σημαίνει πως κατά τη διάρκεια της διεργασίας, δημιουργείται ένας κύκλος κατανάλωσης-παραγωγής H_2O_2 που καθορίζεται από διάφορους παράγοντες όπως η ένταση της ακτινοβολίας, η θερμοκρασία, το pH, αλλά και η φύση του ίδιου του ρύπου που πρόκειται να οξειδωθεί [204, 205]. Επιπλέον, κατά την ανάπτυξη ενός τέτοιου οξειδωτικού συστήματος πρέπει να επιλέγεται προσεκτικά η αρχική συγκέντρωση H_2O_2 , καθώς έχει παρατηρηθεί πως σε υπερβολικά μεγάλες συγκεντρώσεις το ίδιο το αντιδραστήριο λειτουργεί ως παρεμποδιστής, επιδρώντας στην χημική κινητική των αντιδράσεων σύνθεσής του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση αυτού του κύκλου κατανάλωσης και σύνθεσης H_2O_2 και άρα τελικά μειώνει την αποδοτικότητα της μεθόδου [206].

Γενικότερα, η ΠΟΜΑ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVC}$ αποτελεί μία γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδο επεξεργασίας λυμάτων ή γενικότερου καθαρισμού του νερού. Ωστόσο, είναι ισχυρά εξαρτημένη από παράγοντες που σχετίζονται με τις πειραματικές συνθήκες και τη φύση του οργανικού περιεχομένου. Έτσι, στη βιβλιογραφία παρατηρείται ένα ευρύ φάσμα εργασιών, που μπορεί να έχουν δυνητική προοπτική για 100% οξείδωση, αλλά απαιτούν σημαντικά διαφορετικούς χρόνους επεξεργασίας. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του αντιβιοτικού Σεφτριαξόνη (Ceftriaxone) με μήτρα τη του δείγματος να είναι απλό νερό βρύσης, όπου απαιτούνται μικρές συγκεντρώσεις H_2O_2 και ο χρόνος κυμαίνεται σε μερικά λεπτά, η ανοργανοποίηση δεν ξεπερνάει το 60% [207].

Η ανοργανοποίηση είναι σημαντική παράμετρος στην αξιολόγηση αυτών των μεθόδων, καθώς υπάρχουν περιπτώσεις που τα προϊόντα οξείδωσης ήταν πιο τοξικά από τον αρχικό ρύπο. Συγκεκριμένα σε μία εργασία για την απομάκρυνση Ροξιθρομυκίνης (Roxithromycin) από δείγματα δευτεροταγούς επεξεργασίας αποβλήτων, παρόλο που ο χρόνος διεργασίας ανερχόταν σε μερικές ώρες και η συγκέντρωση H_2O_2 αυξανόταν έως και κατά μία τάξη μεγέθους από την προηγούμενη αναφορά, παρατηρήθηκε η δημιουργία πολύ τοξικών προϊόντων [208]. Σε μία περίπτωση συνθετικού αποβλήτου με ισχυρό σουλφοναμιδικό περιεχόμενο (8 διαφορετικές σουλφοναμίδες) αναφέρθηκε πως τα ετεροκυκλικά τμήματα των μορίων εμφάνισαν ταχύτατη διάσπαση, που οδήγησε σε >99% απομάκρυνση των αντιβιοτικών από το δείγμα [209].

3.2.2. $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ – Fenton

Η μέθοδος Fenton είναι μια πολύ αποτελεσματική λύση στην επεξεργασία αποβλήτων και παρουσιάζει δυνατότητες για εφαρμογές μεγάλης κλίμακας. Για αυτό το λόγο, συναντάται συχνά στη βιομηχανία. Η αρχή της στηρίζεται στην αξιοποίηση δισθενών ιόντων σιδήρου Fe^{2+} για την παραγωγή ριζών OH^\cdot . Συγκεκριμένα, ο δισθενής σίδηρος λειτουργεί ως καταλύτης, που αλληλοεπιδρώντας με το H_2O_2 , το διασπά σε ρίζες, δηλαδή οξειδωτικό μέσο (Εξίσωση 3.5) [210].



Για να είναι καταλυτική αυτή η αντίδραση όμως πρέπει να μετατραπεί ο τρισθενής σίδηρος ξανά σε δισθενή. Ο μηχανισμός αυτός εξηγείται από την αντίδραση τις εξισώσεις 3.6 και 3.7.

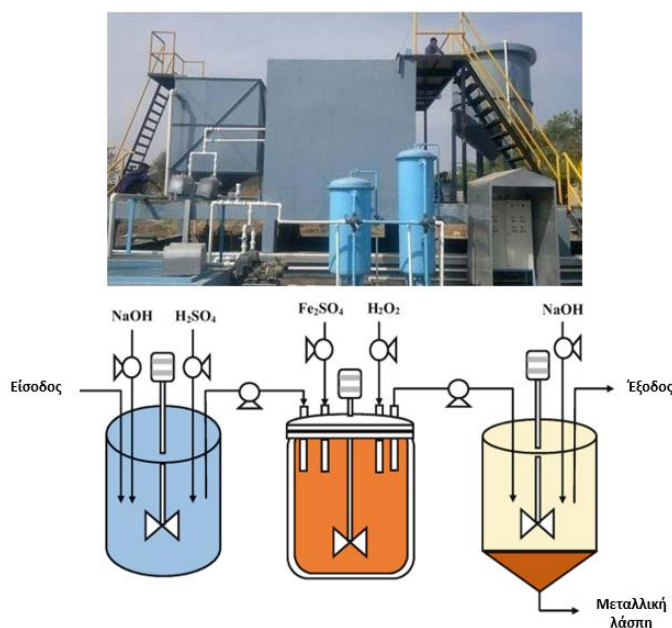


Με αυτόν τον τρόπο συμπληρώνεται ο καταλυτικός κύκλος, ώστε να μπορεί να συνεχίζεται η παραγωγή ριζών OH^\cdot , για όσο υπάρχει διαθέσιμο H_2O_2 στο σύστημα [211]. Απουσία ιόντων Fe^{2+} , που συνήθως είναι διαθέσιμα από σχετικά άλατα, δεν μπορεί να παρατηρηθεί σχηματισμός ριζών OH^\cdot . Ο ρυθμός οξείδωσης οργανικής ύλης αυξάνεται μαζί με τη συγκέντρωση Fe^{2+} στο διάλυμα, μέχρι το σύστημα να φτάσει σε πλατό. Μετά από ένα κρίσιμο σημείο, που καθορίζεται από τις συνθήκες της διεργασίας, η οποιαδήποτε επιπλέον προσθήκη σιδήρου, δεν εμφανίζει καμία επίδραση στο σύστημα και συνεπώς οδηγεί μόνο σε επιπλέον κόστος [182].

Η μέθοδος Fenton παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς. Αρχικά, η μήτρα του αποβλήτου, που επρόκειτο να υποστεί επεξεργασία, πρέπει να βρίσκεται εντός ενός συγκεκριμένου εύρους pH (3-5). Σε υψηλότερες τιμές pH τα ιόντα σιδήρου δεσμεύονται υπό τη μορφή $\text{Fe}(\text{OH})_3$ και απενεργοποιείται το σύστημα. Επίσης, σε υψηλές τιμές pH το H_2O_2 διασπάται σε O_2 και H_2O [182].

Εκτός των πρακτικών προβλημάτων που αφορούν τη μέθοδο Fenton, υπάρχουν και νομικές δυσκολίες που εντοπίζονται κυρίως στην Ευρώπη. Το νομοθετικό πλαίσιο που έχει οριστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση, σχετικά με την ποιότητα του νερού, θέτουν πολύ χαμηλά επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης διαλυμένου σιδήρου στα λύματα. Αυτό οδηγεί στην ανάγκη εφαρμογής επιπλέον επεξεργασίας προκειμένου να απομακρυνθεί το μέταλλο πριν την απόθεσή τους στο περιβάλλον, όπως φυσικοχημική κροκίδωση, λήψη της μεταλλικής λάσπης και αυτόνομη διαχείρισή της, χρήση μεμβρανών νανοδιήθησης και άλλα (**Εικόνα 3.1**). Αυτό αυξάνει σημαντικά τόσο το κόστος, όσο και την πολυπλοκότητα των εφαρμογών αυτών και οδηγεί στην αναζήτηση εναλλακτικών λύσεων [182, 212].

Η διεθνής βιβλιογραφία είναι πλούσια σε μελέτες διαφόρων εφαρμογών. Για παράδειγμα, σε αναφορές όπου επιχειρήθηκε η οξείδωση της Σιπροφλοξακίνης (Ciprofloxacin) παρουσιάζονται αποτελέσματα που σε διάστημα 15-45 λεπτών, παρατηρήθηκαν ποσοστά οξείδωσης 70-76%. Ωστόσο, όπως αναφέρουν οι σχετικές δημοσιεύσεις, τα επίπεδα ανοργανοποίησης παρέμειναν σχετικά χαμηλά (περίπου 50%) [213, 214].



Εικόνα 3.1. Μονάδα επεξεργασίας αποβλήτων με εφαρμογή της μεθόδου Fenton. Στο τελευταίο τμήμα της διάταξης, υπάρχει μονάδα καθίζησης μεταλλικής λάσπης [215, 216].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει μια περίπτωση που αφορά τη Σουλφαμεθοξαζόλη (Sulfamethoxazole), όπου σε συνθετικό δείγμα με καθαρό νερό υπήρχε πλήρης απομάκρυνση του ρύπου, ενώ σε συνθετικό απόβλητο, το λοιπό οργανικό φορτίο λειτουργούσε παρεμποδιστικά και οδηγούσε σε μείωση της οξείδωσης του ρύπου κατά 66%. Ωστόσο, πολύτιμες είναι οι παρατηρήσεις σχετικά με το μηχανισμό οξείδωσης του σουλφοναμιδίου, με οξείδωση του αμινικού άκρου και λύση του δεσμού SH-Phe [217].

3.2.3. $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVC}$ – Photo-Fenton

Η μέθοδος Photo-Fenton συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των μεθόδων που έχουν στο επίκεντρο της αρχής τους το H_2O_2 και αναφέρθηκαν παραπάνω. Η υπεριώδης ακτινοβολία έχει φανεί πως επιταχύνει τις αντιδράσεις Fenton και συνεπώς, σε εφαρμογές της συγκεκριμένης συνδυαστικής ΠΟΜΑ ευνοείται η αύξηση της απόδοσης οξείδωσης του ρύπου. Για αυτό το λόγο το συγκεκριμένο σύστημα θεωρείται αρκετά υποσχόμενο [218, 219].

Στη Photo-Fenton πραγματοποιούνται 2 βασικές αντιδράσεις:

Αρχικά το υπεροξείδιο διασπάται και δίνει ρίζες $\cdot\text{OH}$, σύμφωνα με τη γενική αντίδραση της εξίσωσης 3.8 [202].



Παράλληλα, πραγματοποιείται αναγωγή του Fe^{3+} σε Fe^{2+} , μια αντίδραση (εξίσωση 3.9) που εκκινείται ενεργειακά χάρη στην υπεριώδη ακτινοβολία. Με αυτόν τον τρόπο παράγονται δισθενή ιόντα σιδήρου Fe^{2+} που αλληλοεπιδρούν άμεσα με το H_2O_2 και παράγουν οξειδωτικά μέσα, σύμφωνα με την αρχή της κλασικής διεργασίας Fenton (Εξίσωση 3.5) [220]. Κατά αυτόν τον τρόπο, θα έλεγε κανείς πως η υπεριώδης ακτινοβολία επιταχύνει τον κύκλο $\text{Fe}^{3+} - \text{Fe}^{2+}$ και ευνοεί την παραγωγή ριζών $\text{OH}\cdot$.





Επιπλέον, έχει προταθεί ένας μηχανισμός, όπου τα ιόντα τρισθενούς σιδήρου Fe^{3+} διεγείρονται από την υπεριώδη ακτινοβολία και αντιδρούν με το H_2O_2 , παράγοντας ρίζες OH^\cdot παράλληλα με δισθενή ιόντα σιδήρου (εξίσωση 3.10), τα οποία με τη σειρά τους θα αντιδράσουν με το H_2O_2 [221].



Ο μηχανισμός αυτός καθιστά την Photo-Fenton μία από τις πιο αποδοτικές ΠΟΜΑ για τον καθαρισμό του νερού, την επεξεργασία λυμάτων και την απομάκρυνση φαρμακευτικών ρύπων από αυτά πριν τη διάθεσή τους στο περιβάλλον.

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου Photo-Fenton είναι εμφανής στη διεθνή βιβλιογραφία, μέσω των διάφορων εφαρμογών. Για να γίνουν αισθητά τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μεθόδου, αξίζει να αναφερθεί μία μελέτη για την οξείδωση και διάσπαση του αντιβιοτικού Σιπροφλοξακίνη (Ciprofloxacin). Σύμφωνα με τους συγγραφείς, τα επίπεδα απομάκρυνσης ανέρχονταν στο 93%, σε 45 λεπτά διεργασίας. Επιπλέον, η ανοργανοποίηση έφτανε το 70% [222]. Αν συγκρίνουμε αυτή τη μελέτη, με τα αποτελέσματα άλλων εργασιών που αναφέρθηκαν παραπάνω [213, 214], παρατηρείται πως τόσο η απομάκρυνση του ρύπου αυτού καθ' αυτού, όσο και η ανοργανοποίηση, φτάνουν σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στην περίπτωση της Photo-Fenton. Εξίσου ενδιαφέρονσα είναι μία εφαρμογή με στόχο την απομάκρυνση Οξακιλλίνης (Oxacillin) από το ένα συνθετικό διάλυμα. Σε αυτήν την περίπτωση, παρατηρείται πλήρης απομάκρυνση (100%) του αντιβιοτικού, σε μόλις 20 λεπτά διεργασίας. Ταυτόχρονα, σημειώνεται πως το λύμα, κατόπιν επεξεργασίας με Photo-Fenton εμφανίζει μηδενική αντιμικροβιακή δράση [223].

3.3. Διεργασίες με βάση το όζον O_3 .

Το αντιδραστήριο του υπεροξειδίου του υδρογόνου μπορεί να συνδυαστεί με διάφορα άλλα αντιδρώντα, προκειμένου να σχηματίσει μεθόδους με οξειδωτική δράση απέναντι σε ρύπους. Ένα τέτοιο αντιδραστήριο είναι το όζον. Ωστόσο, για την οικονομία της εργασίας, η συγκεκριμένη μέθοδος δεν αναφέρθηκε παραπάνω και θα αποτελέσει μέρος της ενότητας που περιγράφει τις μεθόδους με βάση το όζον.

Το όζον είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό αντιδραστήριο, που παρουσιάζει πολλές προοπτικές για εφαρμογές σε ΠΟΜΑ. Λόγω του υψηλού δυναμικού του ($E^\circ = 2.08 \text{ V}$), είναι ικανό να αντιδράσει με μεγάλο φάσμα οργανικών και ανόργανων ενώσεων, ενώ φαίνεται να μη σχηματίζει τοξικά παραπροϊόντα. Έτσι οι διεργασίες με όζον, καταλήγουν να έχουν μεγάλη αξία σε εφαρμογές αντιρρύπανσης. Πρέπει να αναφερθεί ωστόσο, ότι το όζον δεν είναι ένα αντιδραστήριο που εμφανίζει χαμηλό κόστος παραγωγής. Συνήθως η σύνθεση γίνεται ηλεκτροχημικά, με εκκενώσεις σε περιβάλλον αέριου οξυγόνου, που απαιτούν υψηλά ποσά ηλεκτρικής ενέργειας (Εικόνα 3.2). Έτσι, η κλιμάκωση τέτοιων μεθόδων συνήθως είναι οικονομικά μη-βιώσιμη [224, 225].



Εικόνα 3.2. Σύστημα σύνθεσης όζοντος με ηλεκτρικές εκκενώσεις [226].

3.3.1. O₃ - Οξονισμός.

Ο άμεσος οξονισμός του λύματος αποτελεί την πιο απλή έκδοση της εν λόγω κατηγορίας. Οι βασικοί μηχανισμοί αυτής της εφαρμογής είναι 2: η απευθείας αντίδραση με το διαλυμένο O₃ και η έμμεση οξείδωση των ρύπων, κατόπιν σχηματισμού ριζών OH[•]. Γενικότερα, ο μηχανισμός που θα εφαρμοστεί πραγματικά σε ένα σύστημα εξαρτάται από πληθώρα παραμέτρων, όπως η δόση O₃, η φύση του ρύπου, η θερμοκρασία και το χημικό περιβάλλον της μήτρας. Για παράδειγμα, σε συνθήκες pH < 4 παρατηρείται πως υπερισχύει σε σχεδόν απόλυτο βαθμό ο μηχανισμός της άμεσης οξείδωσης, μέσω απευθείας αντίδρασης με διαλυμένο O₃ [182, 227].

Σε αυτήν την περίπτωση, έχει παρατηρηθεί πως το αντιδραστήριο συνήθως χτυπάει διπλούς δεσμούς αζώτου και άνθρακα (-C = C- και -N = N-), για την αποικοδόμηση των ρύπων.

Από την άλλη, σε τιμές pH > 9, ο επικρατέστερος μηχανισμός φαίνεται να είναι αυτός της έμμεσης οξείδωσης, μέσω του σχηματισμού ριζών OH[•]. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί αν ληφθεί υπόψη η αρχή πως η διάσπαση του O₃ σε ελεύθερες ρίζες ευνοείται ανάλογα με την αύξηση του pH (Εξίσωση 3.11).



Η χρήση O₃ σε διεργασίες ΠΟΜΑ εμφανίζει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα. Αρχικά ο όγκος του αποβλήτου παραμένει αμετάβλητος και δεν σχηματίζεται κάποιας μορφής λάσπη. Αυτή είναι μια σπουδαία παράμετρος που πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη όταν υπάρχει στόχος για αξιοποίηση του αποβλήτου, στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας. Επιπλέον, οι εγκαταστάσεις δεν απαιτούν μεγάλο χώρο, ενώ το O₃ παράγεται in situ. Το τελευταίο έχει αξία αν αναλογιστεί κανείς την αύξηση κόστους και δυσκολίας μιας εφαρμογής που απαιτεί την αποθήκευση και σταδιακή προσθήκη εξωτερικών αντιδραστηρίων (π.χ. H₂O₂ και Fe στην περίπτωση της Fenton). Τέλος, καθώς το O₃

διασπάται από μόνο του σε O_2 , δεν υπάρχει προβληματισμός σχετικά με την παραμονή αντιδραστηρίων στο λύμα, που θα το έθεταν ενδεχομένως σε πλαίσια εκτός της υφιστάμενης νομοθεσίας [182, 187].

Τη μόνη βασική εξαίρεση στην τελευταία πρόταση αποτελούν οι περιπτώσεις δειγμάτων που έχουν υψηλή συγκέντρωση ιόντων βρωμίου. Σε τέτοιες περιπτώσεις σχηματίζονται ιόντα BrO_3^- , που έχει αποδειχθεί πως είναι ιδιαίτερα καρκινογόνα, με αποτέλεσμα να ελέγχεται η απελευθέρωσή τους από τη βιομηχανία. Ένας τρόπος περιορισμού τους είναι η χρήση μεμβρανών για την συγκράτησή τους [228].

Όπως είναι λογικό, η ευκολία της συγκεκριμένης εφαρμογής έχει οδηγήσει σε ανάπτυξη πολλών σχετικών ερευνών που εμπλουτίζουν σημαντικά τη διεθνή βιβλιογραφία. Οι ενώσεις σουλφοναμιδών έδειξαν να ανταποκρίνονται θετικά στον οξονισμό. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση συνθετικού αποβλήτου, που περιείχε 4 διαφορετικά αντιβιοτικά, την Αμοξικιλίνη (Amoxicillin), την Δοξυκυκλίνη (Doxycycline), την Σιπροφλοξακίνη (Ciprofloxacin) και την Σουλφαδιαζίνη (Sulfadiazine). Στη συγκεκριμένη εργασία σημειώθηκε απομάκρυνση έως 98% στα παραπάνω αντιβιοτικά, ενώ παρατηρήθηκε πως το ποσοστό απομάκρυνσης αυξανόταν σαν αποτέλεσμα την αυξανόμενη συγκέντρωση O_3 [229]. Σε διαφορετική αναφορά, που είχε ως στόχο την απομάκρυνση Σιπροφλοξακίνης, χρησιμοποιήθηκε πολλαπλάσια συγκέντρωση O_3 . Όπως αναφέρουν οι συγγραφείς, παρά την εξαιρετική επίδοση της μεθόδου (95% απομάκρυνση), παρατηρήθηκε πως η υπερβολικά υψηλή συγκέντρωση O_3 μείωνε την ταχύτητα της οξείδωσης και επιδρούσε αισθητά στις κινητικές της διεργασίας [230]. Την ίδια σχέση συγκέντρωσης και απομάκρυνσης επιβεβαιώνει και δημοσιευμένη μελέτη πάνω σε 4 διαφορετικές σουλφοναμίδες σε εμβολιασμένο δείγμα λύματος. Οι ρύποι ήταν η Σουλφαδιαζίνη (Sulfadiazine), η Σουλφαμεθοξαζόλη (Sulfamethoxazole), η Σουλφαμεθιαζόλη (Sulfamethiazole) και η Σουλφαθιαζόλη (Sulfathiazole). Επιπλέον, οι συγγραφείς αναφέρουν πως σε υψηλότερες τιμές pH παρατηρήθηκαν καλύτερα επίπεδα απομάκρυνσης των ρύπων. Αυτό φαίνεται να οφείλεται στην εξαιρετική οξειδωτική δράση των ριζών OH^\cdot , που αποτελούν το οξειδωτικό μέσο του μηχανισμού έμμεσης οξείδωσης [231]. Αυτή η συμπεριφορά φάνηκε να αποτελεί χαρακτηριστικό των σουλφοναμιδικών ενώσεων, σύμφωνα με συμπληρωματικές βιβλιογραφικές αναφορές [232, 233].

3.3.2. O_3/UV .

Ο οξονισμός φαίνεται να παρουσιάζει καλή συμπεριφορά στην επεξεργασία λυμάτων για την απομάκρυνση αντιβιοτικών. Ωστόσο, δεν αναφέρθηκαν ενθαρρυντικά στοιχεία σχετικά με την ανοργανοποίηση, κάτι που φαίνεται να σχετίζεται με τον μηχανισμό δράσης του O_3 . Η κινητική σταθερά της αντίδρασης του O_3 με τους οργανικούς ρύπους είναι αρκετά χαμηλή, με αποτέλεσμα να θέτει εμπόδια στην επίτευξη υψηλών επιπέδων ανοργανοποίησης.

Όπως φάνηκε και στις περιπτώσεις του H_2O_2 και της Fenton, οι ρίζες OH^\cdot αποτελούν τον πυρήνα της επιτυχημένης ανοργανοποίησης, λόγω της έλλειψης εκλεκτικότητας που εμφανίζουν στην αλληλεπίδραση με τους ρύπους. Για να ενισχυθεί η παραγωγή τέτοιων ριζών όμως σε ένα σύστημα οξονισμού, θα πρέπει να ρυθμιστεί το περιβάλλον του λύματος σε υψηλές τιμές pH. Αυτό πρακτικά σημαίνει τη χρήση επιπρόσθετων αντιδραστηρίων και άρα αύξηση του κόστους και της πολυπλοκότητας της διεργασίας.

Μία εύκολη εναλλακτική για την ταχύτερη παραγωγή ριζών OH^\cdot είναι η προσθήκη υπερϊώδους ακτινοβολίας στο σύστημα. Ένα τέτοιο σύστημα παρουσιάζει πληθώρα πλεονεκτημάτων, που το καθιστούν μια από τις πιο ελκυστικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες ΠΟΜΑ. Εκτός της μεγάλης τεχνικής ευκολίας και των υψηλών επιπέδων ανοργανοποίησης, σημαντικό πλεονέκτημα του εν λόγω

συστήματος είναι η αναστολή των μηχανισμών που παράγουν τοξικά BrO_3^- . Ωστόσο, τόσο οι λάμπες UV, όσο και η σύνθεση O_3 καταναλώνουν μεγάλα ποσά ενέργειας και αυξάνουν σημαντικά το κόστος της διεργασίας [234, 235].

Το μόριο του O_3 απορροφά ισχυρά την υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος $\lambda = 254 \text{ nm}$. Αυτή η ακτινοβολία διασπά το O_3 , παράγοντας ρίζες OH^\cdot , μέσω ενός μηχανισμού 2 σταδίων. Στο πρώτο στάδιο (Εξίσωση 4.12) πραγματοποιείται η ομόλυση του μορίου του O_3 και η παραγωγή ατομικού οξυγόνου $\text{O}(^1\text{D})$. Όταν το ατομικό οξυγόνο αντιδράσει με το νερό, που βρίσκεται σε αφθονία, καθώς αποτελεί το διαλύτη, παράγει ρίζες OH^\cdot (Εξίσωση 3.13) [236].



Επιπλέον, έχει προταθεί και ένας παράλληλος μηχανισμός, κατά τον οποίο οι ρίζες OH^\cdot σχηματίζουν H_2O_2 . Αυτός με τη σειρά του αντιδράει στιγμιαία με το O_3 και παράγει εκ νέου ρίζες OH^\cdot [237]. Ο μηχανισμός αυτός περιγράφεται παρακάτω (Εξισώσεις 3.14 – 3.20).



Οι ρίζες OH^\cdot αντιδρούν με τους οργανικούς ρύπους και έτσι παρατηρείται αυτή η σημαντική αύξηση στην ταχύτητα της κινητικής διεργασίας, λόγω της παρουσίας υπεριώδους ακτινοβολίας. Φυσικά, όπως θα αναλυθεί σε παρακάτω ενότητα, το ίδιο το υπεριώδες φως μπορεί να αποικοδομήσει ορισμένες ενώσεις με άμεση φωτόλυση. Επιπλέον, η υπεριώδης ακτινοβολία μπορεί να διεγείρει τα οργανικά μόρια του ρύπου, ευνοώντας ενεργειακά την οξείδωση από τις ρίζες OH^\cdot [238].

Τα πλεονεκτήματα και της συγκεκριμένης ΠΟΜΑ, λόγω της ενισχυμένης κινητικής που προσφέρουν οι ρίζες OH^\cdot , γίνονται εμφανή μέσω των εφαρμογών της. Σε μία συγκριτική μελέτη συνθετικού δείγματος Σιπροφλοξακίνης (Ciprofloxacin) και Τριμεθοπρίμης (Trimethoprim), παρουσιάστηκαν αποτελέσματα που έδειχναν πλήρη απομάκρυνση των αντιβιοτικών (100%). Από το σύνολο των αποτελεσμάτων, φάνηκε πως οι διεργασίες που είχαν ως βάση το O_3 είχαν πολύ καλύτερη συμπεριφορά σε σχέση με τις περιπτώσεις απλής φωτόλυσης, γεγονός που δείχνει την αξία της κινητικής που παρουσιάζει η ΠΟΜΑ O_3/UV [239]. Η αυξημένη κινητική μπορεί να παρατηρηθεί και σε μια εργασία πάνω στην αποικοδόμηση του σουλφοναμιδίου της Σουλφαμεθοξαζόλης (Sulfamethoxazole). Οι συγγραφείς αναφέρουν την πλήρη απομάκρυνση του ρύπου (100% απομάκρυνση) σε μόλις 10 λεπτά διεργασίας, ενώ αξίζει να σημειωθεί πως η διεργασία πραγματοποιήθηκε με μικρή συγκέντρωση O_3 και θερμοκρασία δωματίου, γεγονός που υποδηλώνει πως δεν χρειάστηκε επιπλέον εξοπλισμός για την επίτευξη υψηλών θερμοκρασιών [240]. Σε μια σχετική μελέτη, εφαρμόστηκε η συγκεκριμένη ΠΟΜΑ σε ένα πραγματικό δείγμα λύματος που περιείχε 38 ενώσεις από προϊόντα προσωπικής φροντίδας και υγιεινής. Μεταξύ αυτών ήταν διαφορετικά αντιβιοτικά, όπως Σουλφαμεθοξαζόλη (Sulfamethoxazole), Σουλφαδιμεθοξίνη (Sulfadimethoxine), Σιπροφλοξακίνη (Ciprofloxacin), Τριμεθοπρίμη (Trimethoprim), Αζιθρομυκίνη (Azithromycin) και άλλα. Δεδομένων των παρεμποδιστικών φαινομένων και του ανταγωνισμού στην οξείδωση από άλλες οργανικές ενώσεις, η συμπεριφορά που

αναφέρθηκε ήταν αρκετά ικανοποιητική, καθώς 31/38 ρύποι οξειδώθηκαν σε βαθμό που η συγκέντρωσή τους έπεφτε κάτω από το όριο ανίχνευσής [241].

3.3.3. O_3/H_2O_2 .

Όπως έχει φανεί μέχρι τώρα, η δράση του όζοντος σε ορισμένους τυπικούς ρύπους του νερού είναι αρκετά ικανοποιητική, αποικοδόμηση οργανικών ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους, που έχουν πλούσιο ηλεκτρονιακό περιεχόμενο. Ωστόσο, η αποσύνθεση αυτών των μεγάλων μορίων συνήθως οδηγεί στη δημιουργία προϊόντων οξείδωσης, που επί των πλείστων είναι χαμηλού μοριακού βάρους. Τέτοιες ενώσεις τείνουν να είναι ανθεκτικές στην περαιτέρω οξείδωση, μέσω της απευθείας αλληλεπίδρασης με το όζον. Ως εκ τούτου, παρατηρείται πως παρόλο που οι πρωτογενείς ρύποι αποικοδομούνται εξ ολοκλήρου από τον απλό οζονισμό και το υβριδικό σύστημα οζονισμού παρουσία υπερϊόδους ακτινοβολίας, ο βαθμός ανοργανοποίησης μπορεί να είναι ανεπαρκής [232]. Αυτό είναι ίσως το πιο μελανό σημείο της χρήσης των ΠΟΜΑ με βάση το O_3 , που αναφέρθηκαν μέχρι τώρα. Αυτό το πρόβλημα εντείνεται αν ληφθεί υπόψη το γεγονός πως αυτά τα παραπροϊόντα χαμηλού μοριακού βάρους μπορεί να παρουσιάζουν πιο οξεία τοξικότητα από τους πρωτογενείς ρύπους [242–244].

Η ταυτόχρονη χρήση υπεροξειδίου του υδρογόνου στον οζονισμό μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της διεργασίας, καθώς η αντίδραση του O_3 με το H_2O_2 έχει ως αποτέλεσμα τη ταχύτατη και έντονη δημιουργία ριζών $OH\cdot$. Το σύστημα συνδυασμένης οξείδωσης O_3/H_2O_2 (κοινώς γνωστό ως «peroxone») μπορεί να παράγει υψηλότερες αποδόσεις. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, μια προηγμένη μέθοδος οξείδωσης, κατά την οποία μπορεί να προστεθεί μια μικρή ποσότητα H_2O_2 στο υδατικό διάλυμα στο οποίο διοχετεύεται το O_3 , είναι ιδιαίτερα πρακτική [245].

Σε ένα τέτοιο σύστημα πραγματοποιούνται 2 παράλληλες διεργασίες. Αρχικά, οι οργανικοί ρύποι αντιδρούν απευθείας με το διαθέσιμο O_3 . Ωστόσο, η παρουσία του H_2O_2 ενεργοποιεί έναν μηχανισμό διάσπασής του, μέσω της αλληλεπίδρασής του με το O_3 . Από αυτήν την αντίδραση παράγονται οξειδωτικές ρίζες $OH\cdot$ (Εξίσωση 3.21).



Έχουν γίνει διάφορες μελέτες πάνω στην συγκεκριμένη ΠΟΜΑ, με σκοπό να εκτιμηθεί η αποδοτικότητά της. Οι δημοσιευμένες έρευνες συμφωνούν πως πρόκειται πράγματι για μία επιτυχημένη λύση, στο πρόβλημα της ελλιπούς ανοργανοποίησης των ρύπων. Σε μία περίπτωση οξείδωσης του αντιβιοτικού της Σιπροφλοξακίνης (Ciprofloxacin), σε περιβάλλον από πραγματικό λύμα, παρατηρήθηκε πως σε μόλις 5 λεπτά διεργασίας η απομάκρυνση του ρύπου έφτανε το 99%. Με επιπλέον επιμήκυνση της επεξεργασίας του αποβλήτου, σημειώνεται ανοργανοποίηση πολύ υψηλού βαθμού, που ανέρχεται στο 90% [246]. Διαφορετική μελέτη συνθετικού αποβλήτου, με τον ίδιο ρύπο, έδειξε πως η συγκέντρωση του H_2O_2 αποτελεί μία κρίσιμη παράμετρο. Συγκεκριμένα, φάνηκε πως οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 οδηγούν σε μείωση των επιπέδων αποικοδόμησης, επιδρώντας αρνητικά στις κινητικές που λαμβάνουν χώρα στο σύστημα [247]. Αυτό υποδηλώνει πως σε πραγματικές εφαρμογές, είναι απαραίτητη η διενέργεια μελέτης βελτιστοποίησης των σχετικών παραμέτρων, για τη λήψη επιθυμητών αποτελεσμάτων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει δημοσιευμένη έρευνα πάνω στην εφαρμογή της συγκεκριμένης ΠΟΜΑ στην αποικοδόμηση της Σουλφαμεθοξαζόλης (Sulfamethoxazole). Στην περίπτωση αυτή, φάνηκε πως ακόμα και σε πραγματικά δείγματα λυμάτων, η ανοργανοποίηση έφτανε τα επιθυμητά επίπεδα (>80%). Οι συγγραφείς αναφέρουν πως η χρήση επιπλέον καταλυτών, όπως οξείδια Κοβαλτίου και Αλουμινίου (Co_3O_4 & Al_2O_3), βελτίωναν σημαντικά

τις κινητικές και την ολική απομάκρυνση. Τέλος, και σε αυτήν την εργασία γίνεται αναφορά για παρεμποδιστικά φαινόμενα από το H_2O_2 υψηλής συγκέντρωσης [248].

3.3.4. $O_3/UV/H_2O_2$.

Το σύστημα της ΠΟΜΑ $O_3/UV/H_2O_2$ αποτελεί μία από τις ισχυρότερες οξειδωτικές διεργασίες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως συνδυάζει μεγάλο εύρος μηχανισμών σε παράλληλη δράση, που οδηγούν σε ταχύτερη παραγωγή ριζών OH^\cdot , αλλά και απευθείας διάσπαση των οργανικών ρύπων. Οι μηχανισμοί που λαμβάνουν χώρα σε ένα τέτοιο σύστημα είναι:

- Απευθείας φωτόλυση των ρύπων.
- Οξονισμός και άμεση αντίδραση μεταξύ ρύπων και O_3 .
- Φωτόλυση του O_3 από την υπεριώδη ακτινοβολία, προς την παραγωγή ριζών OH^\cdot .
- Αλληλεπίδραση O_3 και H_2O_2 , προς την παραγωγή ριζών OH^\cdot .
- Φωτόλυση του H_2O_2 από την υπεριώδη ακτινοβολία, προς την παραγωγή ριζών OH^\cdot .

Οι ακριβείς αντιδράσεις των παραπάνω παράλληλων διεργασιών αναφέρονται λεπτομερώς σε άλλες ενότητες του κεφαλαίου. Συνεπώς, δεν χρειάζεται να αναλυθούν και σε αυτό το σημείο.

Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της εν λόγω διεργασίας είναι πως μπορεί να εφαρμοστεί σε ήπιες συνθήκες. Αυτό σημαίνει πως είναι εφικτή η πραγματοποίηση επεξεργασίας λυμάτων σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και θερμοκρασίας δωματίου. Ωστόσο, το υψηλό κόστος των τριών στοιχείων, που αποτελούν το σύστημα (δηλαδή το O_3 , το H_2O_2 και το υπεριώδες φως), θέτει ένα σημαντικό εμπόδιο, που περιορίζει την ευρύτερη χρήση και κλιμάκωση αυτής της διαδικασίας. Κατά συνέπεια, η χρήση αυτού του τριμερούς συστήματος περιορίζεται συνήθως μόνο στην επεξεργασία υψηλά μολυσμένων ουσιών για την επίτευξη επαρκούς αποικοδόμησης και ανοργανοποίησης των ανθεκτικών ρύπων [249, 250].

Το υψηλό κόστος περιορίζει σημαντικά το πεδίο εφαρμογής, κάτι που γίνεται αισθητό σε μία προσπάθεια βιβλιογραφικής ανασκόπησης. Οι δημοσιευμένες εφαρμογές αφορούν κυρίως πολύ τοξικούς ρύπους και εστιάζουν περισσότερο στην διάσπασή τους, για την ασφαλή εναπόθεση του λύματος στο περιβάλλον, παρά στην ανοργανοποίηση υψηλού βαθμού που θα επέτρεπε ενδεχομένως την άμεση αξιοποίηση του υδατικού σώματος. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση ενός δείγματος Χλωροτετρακυκλίνης (Chlortetracycline) σε πραγματικό απόβλητο. Η μέθοδος φάνηκε αποτελεσματική, καθώς σε 15 λεπτά υπήρχε πλήρης διάσπαση του τοξικού ρύπου, ωστόσο δεν αναφέρθηκε πλήρης ανοργανοποίηση [251]. Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι μία μελέτη που αναφέρθηκε και προηγουμένως, καθώς αφορούσε την απομάκρυνση των αντιβιοτικών της Σιπροφλοξακίνης (Ciprofloxacin) και της Τριμεθοπρίμης (Trimethoprim) από ένα διάλυμα φωσφορικών αλάτων. Τα άλατα αυτά συχνά λειτουργούν παρεμποδιστικά, παρεμβαίνοντας στους μηχανισμούς παραγωγής οξειδωτικών ριζών. Έτσι, η προσπάθεια εφαρμογής πολλαπλών μηχανισμών, θα μπορούσε να εξασφαλίσει την διάσπαση των ρύπων. Πράγματι, τα δημοσιευμένα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας, επιβεβαιώνουν την υψηλή διάσπαση των ρύπων (>90%), σημειώνοντας πως οι μηχανισμοί με βάση την απευθείας οξείδωση με O_3 , φάνηκαν κρίσιμοι στο συγκεκριμένο σύστημα [239].

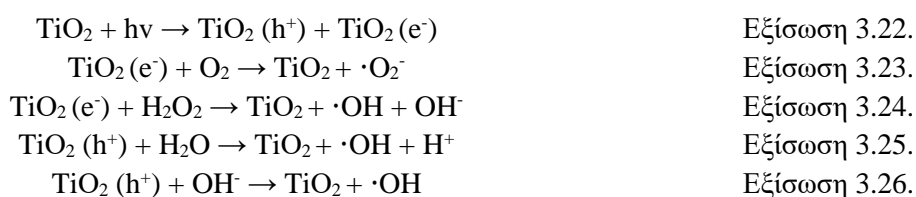
3.4. TiO_2/UV – Ετερογενής φωτοκατάλυση.

Ως *φωτοκατάλυση* ορίζεται η επιτάχυνση μιας φωτοχημικής αντίδρασης από την παρουσία ενός ημιαγωγού που ενεργοποιείται από την απορρόφηση ακτινοβολίας, με ενέργεια μεγαλύτερη από το διάκενο μεταξύ της ζώνης σθένους και της ζώνης αγωγιμότητας του. Ο όρος *ετερογενής* αναφέρεται στο γεγονός ότι οι ρύποι υπάρχουν διαλυμένοι σε μια ρευστή φάση, ενώ ο καταλύτης βρίσκεται στη στερεή φάση. Συνήθως, οι καταλύτες που χρησιμοποιούνται αποτελούνται από οξείδια ευγενών μετάλλων, όπως (TiO_2 , Al_2O_3 , ZrO_2 και CeO_2) [252]. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος καταλύτης είναι το διοξείδιο του τιτανίου (TiO_2) λόγω της υψηλής χημικής του σταθερότητας, του χαμηλού κόστους και των εξαιρετικών αποτελεσμάτων που έχει αποδειχθεί ότι παρέχει, μέσω των διάφορων εφαρμογών [253–255].

Το πρώτο μέρος του μηχανισμού της ΠΟΜΑ ετερογενούς φωτοκατάλυσης είναι η απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας από τον καταλύτη. Με αυτόν τον τρόπο, σχηματίζονται ζεύγη οπών και ηλεκτρονίων (h^+/e^-). Με αυτόν τον τρόπο εκκινείται η διεργασία και η παραγωγή οξειδωτικών μέσων. Στις εφαρμογές ΠΟΜΑ, οι συνθήκες είναι αερόβιες, γεγονός που σημαίνει πως υπάρχει διαθέσιμο οξυγόνο στο σύστημα. Τόσο το οξυγόνο, όσο και το νερό, μπορούν να προσροφηθούν στην επιφάνεια του καταλύτη, όπου θα μετατραπούν σε ρίζες.

Τα ηλεκτρόνια του ενεργοποιημένου καταλύτη ($\text{TiO}_2(e^-)$), είναι εξαιρετικά αναγωγικά. Έτσι, μειώνουν το οξυγόνο που προσροφάται στην επιφάνεια του TiO_2 , προκαλώντας έτσι τη δημιουργία ιόντων ρίζας υπεροξειδίου (O_2^-). Αντιστρόφως, οι οπές προκαλούν την οξείδωση νερού, καθώς και άλλων προσροφημένων ειδών (π.χ. αντιδραστηρίων όπως το H_2O_2). Οι ρίζες OH^\cdot , που προκύπτουν από αυτήν την αντίδραση, θα οξειδώσουν τις οργανικές ενώσεις των ρύπων. Επιπλέον, η οργανική ύλη προσροφάται επίσης στην επιφάνεια του καταλύτη και μπορεί να οξειδωθεί άμεσα με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από αυτόν [256, 257].

Έτσι, στην επιφάνεια του καταλύτη συνυπάρχουν παράλληλες αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής, που συνθέτουν ένα περίπλοκο σύστημα ΠΟΜΑ. Οι φωτοδημιουργούμενες οπές προκαλούν αντιδράσεις φωτοοξείδωσης, ενώ τα ηλεκτρόνια στη ζώνη αγωγιμότητας προκαλούν αντιδράσεις φωτοαναγωγής. Ο συνολικός μηχανισμός περιγράφεται στις εξισώσεις 3.22-3.26.



Τα κύρια πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης ΠΟΜΑ είναι ότι μπορεί να λειτουργήσει σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και θερμοκρασίας δωματίου, και το σχετικά χαμηλό κόστος λόγω της επαναχρησιμοποίησης του καταλύτη. Επίσης, αυτό το σύστημα παρουσιάζει εξαιρετική συμπεριφορά αναφορικά με την πλήρη ανοργανοποίηση πολλών ρύπων. Ωστόσο, έχει σημαντικά μειονεκτήματα, όπως τις δυσκολίες που σχετίζονται με τις διατάξεις μεγάλης κλίμακας. Αρχικά, είναι αρκετά δύσκολο να επιτευχθεί ομοιόμορφη ακτινοβολία σε ολόκληρη την επιφάνεια του καταλύτη. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως δεν γίνεται εκμεταλλεύσιμο το σύνολο του καταλύτη και άρα μειώνεται η οικονομική και ενεργειακή αποδοτικότητα του συστήματος [258]. Σημαντικό μειονέκτημα, επί της αρχής της μεθόδου, αποτελεί η ακτινοβολία που απαιτείται για την ενεργοποίηση του καταλύτη. Στην περίπτωση του TiO_2 , απαιτείται ακτινοβολία στο φάσμα του υπεριώδους. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως, το TiO_2 δεν μπορεί να απορροφήσει περισσότερο από το 5% του ηλιακού φάσματος, κάτι που θα έριχνε σημαντικά το

κόστος κλιμάκωσης της μεθόδου, αξιοποιώντας την άφθονη ηλιακή ενέργεια [259]. Η ενίσχυση της καταλυτικής δραστηριότητας του TiO_2 εντός της ορατής ζώνης του ηλιακού φάσματος έχει λάβει μεγάλη προσοχή από την επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια. Έχουν ακολουθηθεί διαφορετικές στρατηγικές για τη βελτίωση των φωτοκαταλυτικών ιδιοτήτων των καταλυτών (υπό ορατή ακτινοβολία), όπως η τροποποίηση της επιφάνειας με οργανικά μόρια [260], νανοσωματίδια [261, 262], το ντόπινγκ με άλλα μέταλλα [261, 263–265] και αμέταλλα στοιχεία [263, 266, 267] και άλλα.

Η διαδικασία της φωτοκαταλυτικής οξείδωσης, δηλαδή η ταυτόχρονη εφαρμογή αέρα ή οξυγόνου, ακτινοβολίας UV και ημιαγωγού (κυρίως TiO_2), είναι μια ευρέως γνωστή διαδικασία που εφαρμόζεται στην απομάκρυνση πολλών ενώσεων αλλά δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως σε μεγάλη κλίμακα, κυρίως λόγω της ανάγκης διαχωρισμού του φωτοκαταλύτη. Εάν χρησιμοποιείται σε σκόνη (μέγεθος σωματιδίων στην περιοχή των δεκάδων nm), το TiO_2 παρουσιάζει υψηλή αποτελεσματικότητα. Σε αυτό το σημείο όμως, εντοπίζεται ένα σημαντικό πρόβλημα. Η ύπαρξη του καταλύτη σε μορφή εναιωρήματος διαμορφώνει την ανάγκη για μια επακόλουθη επεξεργασία διαχωρισμού, με στόχο την ανάκτηση του καταλύτη. Αυτό το γεγονός καθιστά τη διαδικασία πιο δαπανηρή και περίπλοκη, ιδιαίτερα αναφορικά με ζητήματα αυτοματισμού [268].



Εικόνα 3.3. Πιλοτικό σύστημα ετερογενούς φωτοκατάλυσης, συζευγμένης με μεμβράνες υπερδιήθησης κοίλων οινών (PMR), από τις εγκαταστάσεις του ΕΦΕΜ, ΕΚΕΤΑ.

Μία λύση είναι οι μονάδες υβριδικών Αντιδραστήρων Μεμβρανών-Φωτοκατάλυσης (Photocatalytic Membrane Reactors – PMR), όπως αυτές που έχουν αναπτύξει το Εργαστήριο Φυσικών πόρων και Εναλλακτικών Μορφών ενέργειας, του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης και το Εργαστήριο Ελέγχου Ρύπανσης Περιβάλλοντος του Κέντρου Διεπιστημονικής Έρευνας και Καινοτομίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, στα οποία πραγματοποιήθηκε το

πειραματικό μέρος της συγκεκριμένης εργασίας. Τέτοια συστήματα αξιοποιούν μεμβράνες για την συγκράτηση του καταλύτη και την παραλαβή διηθήματος, το οποίο έχει δεχθεί οξείδωση και είναι απαλλαγμένο από ρύπους [269–271]. Στην **Εικόνα 3.3** φαίνεται πιλοτική μονάδα τύπου PMR, από τις εγκαταστάσεις του ΕΦΕΜ, ΕΚΕΤΑ.

Οι διάφορες εφαρμογές που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία αναδεικνύουν την υψηλή αποδοτικότητα της εν λόγω ΠΟΜΑ. Συνθετικό δείγμα με το αντιβιοτικό Σιπροφλοξακίνη (Ciprofloxacin) δέχθηκε κατεργασία με ετερογενή φωτοκατάλυση, με καταλύτη TiO_2 . Σύμφωνα με τους συγγραφείς, σε 45 λεπτά διεργασίας υπήρχε πλήρης διάσπαση (100%) του ρύπου, ενώ σε 90 λεπτά διεργασίας, σημειώθηκε ολοκληρωτική ανοργανοποίησή του [272]. Παρόμοια συμπεριφορά σημειώθηκε και σε πειράματα που αφορούσαν την οξείδωση του αντιβιοτικού Κλοξακιλλίνη (Cloxacillin). Συγκεκριμένα, τόσο σε απλά διαλύματα του ρύπου, όσο και συνθετικά απόβλητα φαρμακευτικών προϊόντων και προϊόντων προσωπικής φροντίδας, σημειώθηκε 100% οξείδωση του ρύπου, με την ανοργανοποίηση (κατόπιν επιμήκυνσης της διεργασίας) να φτάνει το 90%. Επιπλέον, συγγραφείς αναφέρουν, πως σε συγκριτική μελέτη, φάνηκε πως η ετερογενής φωτοκατάλυση ήταν από τα πιο αποδοτικά συστήματα, λόγω υψηλών ποσοστών διάσπασης και ανοργανοποίησης των ρύπων [223, 273].

4. Αναλυτικός Προσδιορισμός Αντιβιοτικών

Η ρύπανση των υδάτινων πόρων αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της σύγχρονης εποχής. Όπως είδαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο, αρκετοί ενεργοί φαρμακευτικοί παράγοντες και τα προϊόντα μετασχηματισμού τους εισέρχονται στο περιβάλλον, μέσω των λυμάτων, καθώς η διάσπασή τους δεν καθίσταται πάντα εφικτή από τις μονάδες επεξεργασίας αποβλήτων. Τα μόρια αυτά παραμένουν ανθεκτικά και βιολογικά ενεργά σε διάφορα υδάτινα περιβάλλοντα, αυξάνοντας τον προβληματισμό της επιστημονικής κοινότητας. Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί κατά τα τελευταία χρόνια για τη διερεύνηση της τοξικότητας και των ευρύτερων επιπτώσεων των φαρμακευτικών ρύπων σε ανθρώπους και θαλάσσιους οργανισμούς. Γενικό συμπέρασμα φαίνεται να αποτελεί η διαπίστωση πως οι ρύποι αυτοί δεν χρειάζεται να εντοπίζονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις για να προκαλέσουν πρόβλημα στα οικοσυστήματα ή τον άνθρωπο. Συγκεκριμένα, στις περισσότερες περιπτώσεις, εντοπίζονται σε συγκεντρώσεις της τάξης των μερικών $\mu\text{g/L}$ μέχρι και ng/L [274].

Επιπλέον, οι ρύποι δεν εμφανίζονται σε μόνο μία μορφή. Εφόσον συχνά πρόκειται για πολύπλοκα οργανικά μόρια, είναι συχνό το φαινόμενο συνύπαρξης πολλαπλών ισομερών, εναντιομερών, διαστερομερών ή άλλων ανάλογων ενός ρύπου στο ίδιο σύστημα. Επίσης, συχνά συναντάται δυσκολία στον προσδιορισμό συγκεκριμένων ενώσεων, που δεν οφείλεται στη φύση των ίδιων των αναλυτών, αλλά στην μήτρα των περιβαλλοντικών δειγμάτων. Αυτό πρακτικά αναγκάζει τους χημικούς αναλυτές στο να αναζητήσουν εναλλακτικές μεθόδους που είναι συμβατές με το δείγμα, ή να το επεξεργαστούν με τρόπο που δεν θα αλλοιώσει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων [275, 276].

Ο κλάδος της αναλυτικής χημείας παίζει έναν καθοριστικό ρόλο σε αυτό το ζήτημα, καθώς προσφέρει τα εργαλεία για την παρακολούθηση αυτών των ρύπων. Μάλιστα, αξίζει να τονισθεί πως ένας βασικός λόγος, που η λίστα με τους αναδυόμενους ρύπους αυξάνεται διαρκώς, είναι η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων που επιβεβαιώνουν την ύπαρξη πρωτοεμφανιζόμενων ενώσεων στο περιβάλλον [275]. Συνεπώς οι ρύποι αυτοί είναι «αναδυόμενοι», ακριβώς γιατί εντοπίζονται πρόσφατα στο περιβάλλον και στερούνται επικυρωμένων αναλυτικών μεθόδων ρουτίνας για σωστή αναγνώριση και ποσοτικοποίηση τους.

Σε αυτό το κεφάλαιο θα αναλυθούν οι διαθέσιμες χημικές μέθοδοι ανάλυσης, για την παρακολούθηση φαρμακευτικών ρύπων, καθώς και οι παράμετροι που τις επηρεάζουν.

4.1. Κατηγορίες υποστρωμάτων περιβαλλοντικών δειγμάτων.

Μια από τις πρώτες και σημαντικότερες πληροφορίες που καλείται να διαχειριστεί ένας χημικός αναλυτής, όταν παραλαμβάνει ένα δείγμα, είναι αυτή που αφορά τη μήτρα του. Στη χημική ανάλυση, η *μήτρα* (*matrix*) αναφέρεται στο σύνολο των συστατικών ενός δείγματος, εκτός από την ένωση του αναλύτη [277]. Πρόκειται για μια παράμετρο που μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στον τρόπο διεξαγωγής της ανάλυσης και στην ποιότητα των αποτελεσμάτων, κάτι που συναντάται στη βιβλιογραφία με τον όρο «matrix effects» [278].

Οι κυριότερες κατηγορίες μητρών στις οποίες εντοπίζονται φαρμακευτικοί ρύποι και έχει αξία η ανάλυσή τους είναι [279]:

- Λύματα, απόβλητα και λάσπη
- Επιφανειακά Νερά και Ιζήματα
- Έδαφος και πόσιμο νερό

- Βιόκοσμος (Biota).

Για την περιγραφή της κάθε μήτρας, θα ακολουθηθεί η σειρά της έκθεσης στον ρύπο, σύμφωνα με τον κύκλο του, από το απόβλητο στους οργανισμούς.

4.1.1. Λύματα, απόβλητα και λάσπη.

Όπως εξηγήθηκε στο Κεφάλαιο 2, η κύρια πηγή φαρμακευτικών ρύπων στο περιβάλλον είναι οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων. Αρχικά, τέτοια δείγματα συχνά χαρακτηρίζονται από πληθώρα οργανικών και ανόργανων ενώσεων, που συχνά λειτουργούν παρεμποδιστικά, υπερκαλύπτοντας το σήμα των αναλυτών. Ταυτόχρονα, μπορούν να θέσουν την λειτουργική ακεραιότητα των ευαίσθητων οργάνων ανάλυσης σε κίνδυνο, καθώς οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές επιμολύνσεις, σε διάφορα μέρη ενός οργάνου.

Στην περίπτωση δειγμάτων λυματολάσπης, η παρουσία μεγάλων ποσοτήτων στερεών (π.χ. λίπη, πρωτεΐνες και άλλα) στο περιβάλλον του δείγματος, συχνά το καθιστούν μη-συμβατό με όργανα που χρησιμοποιούν τριχοειδής δειγματολήπτες, όπως όλα τα συστήματα υγρής χρωματογραφίας [280, 281].

Επιπλέον, λόγω της φύσης των μονάδων επεξεργασίας λυμάτων, από τις οποίες λαμβάνονται αυτά τα δείγματα, πολλές φορές είναι πιθανό ο ρύπος να έχει υποστεί αλλαγές. Σε τέτοιες εγκαταστάσεις, συνυπάρχουν μικροοργανισμοί και οξειδωτικές μέθοδοι, ακριβώς για να διασπούν οργανικούς ρύπους. Παράλληλα, η παρουσία μεγάλων αρνητικών επιφανειακών φορτίων που δίνουν πολλαπλές ενεργές θέσεις στις φορτισμένες οργανικές ενώσεις, μπορούν να προκαλέσουν την αντίδραση ενός συγκεκριμένου αναλύτη και συνεπώς την αλλαγή της χημικής του δομής [280]. Συνεπώς, είναι πολύ σημαντικό ένας αναλυτής να γνωρίζει τη δομή του αναλύτη (ή αναλυτών), για τον οποίο σχεδιάζει μία αναλυτική μέθοδο.

4.1.2. Επιφανειακά νερά και ιζήματα.

Οι φαρμακευτικοί ρύποι, αφού απελευθερωθούν από τις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων, εισέρχονται στα επιφανειακά ύδατα. Συνήθως εντοπίζονται σε συγκεντρώσεις ενός εύρους από μερικά ng/L έως και μg/L. Τα επίπεδα αυτά δεν είναι πάντα σταθερά, με τη διακύμανσή τους να καθορίζεται από παράγοντες όπως η αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας των λυμάτων, οι μετεωρολογικές συνθήκες (κυρίως βροχοπτώσεις, κατά τις οποίες πραγματοποιείται αραιώση), η εγγύτητα του σημείου δειγματοληψίας σε εγκαταστάσεις λυμάτων και οι περιβαλλοντικές συνθήκες στην συγκεκριμένη γεωγραφική θέση [282, 283].

Οι ρύποι αυτοί μπορούν να περάσουν από διάφορες περιβαλλοντικές διεργασίες, κυρίως φωτόλυση και προσρόφηση από ιζήματα. Συγκεκριμένα, μεγάλος αριθμός αντιβιοτικών ουσιών φαίνεται να προσροφώνται και να παγιδεύονται στους πόρους των ιζημάτων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η διαλυτότητά τους [284]. Ένας αναλυτής πρέπει να λαμβάνει υπόψη του τον συγκεκριμένο παράγοντα, καθώς μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τα αποτελέσματα μιας σχετικής ανάλυσης. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η λήψη αντιπροσωπευτικών δειγμάτων, καθώς και η κατάλληλη επεξεργασία τους, πριν την ανάλυση.

4.1.3. Έδαφος και πόσιμο νερό.

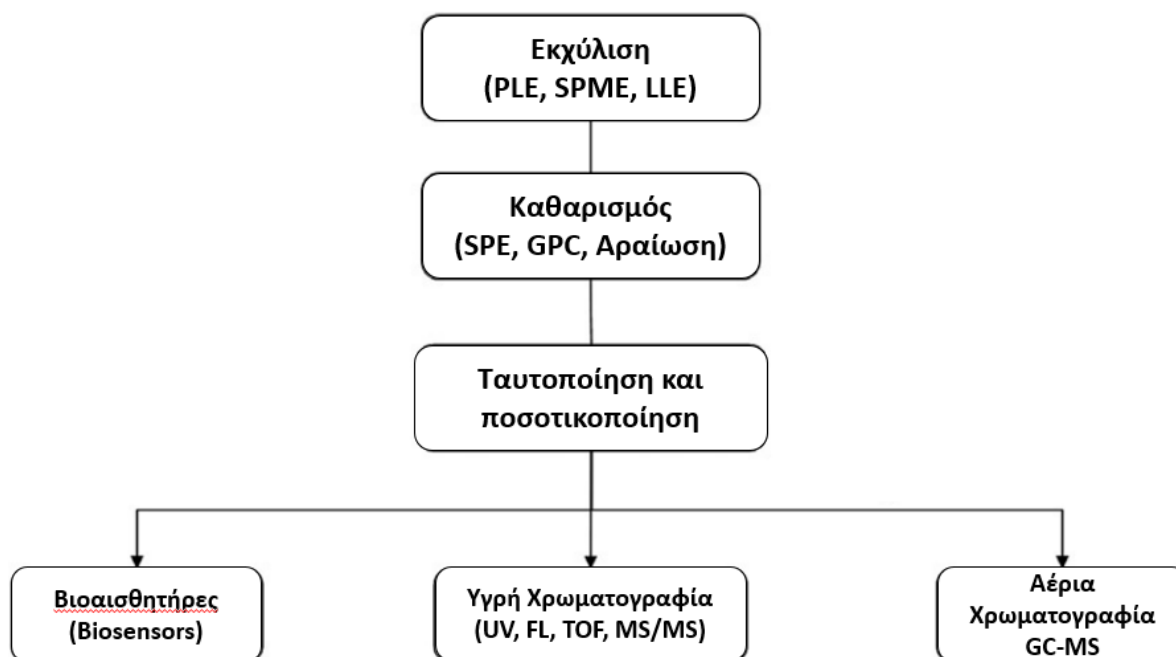
Οι φαρμακευτικοί ρύποι μπορούν να εισέλθουν στο έδαφος μέσω της χρήσης ζωικών αποβλήτων ως λιπάσματα, της χρήσης βιολάσπης για τη βελτίωση του εδάφους, της υγειονομικής ταφής και των εγκαταστάσεων άρδευσης νερού. Οι ρύποι που συναντώνται στο σώμα του εδάφους μπορούν να παρασυρθούν (π.χ. μέσω βροχοπτώσεων) και να φτάσουν στα υπόγεια ύδατα, οδηγώντας τελικά σε επέκταση της ρύπανσης στην πηγή του πόσιμου νερού.

Η συμπεριφορά της μήτρας των υπογείων υδάτων, πρακτικά, παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με αυτήν των επιφανειακών. Ωστόσο, στην περίπτωση του εδάφους η κατάσταση είναι αρκετά διαφορετική. Όπως είναι λογικό, στην πλειοψηφία τους, τα δείγματα εδάφους κατακλύζονται από υλικά στερεής φάσης. Οι ενώσεις των φαρμακευτικών ρύπων όμως, πρέπει να βρίσκονται διαλυμένες σε υγρή φάση, ώστε να καταστεί εφικτός ο προσδιορισμός τους. Για να γίνει αυτό, συχνά απαιτείται ειδική επεξεργασία του δείγματος, με στόχο την παραλαβή οργανικών ενώσεων με εκχύλιση [285, 286].

4.1.4. Βιόκοσμος (Biota).

Ένα οικοσύστημα αποτελείται από μια βιοτική κοινότητα και το αβιοτικό περιβάλλον της, τα οποία βρίσκονται σε διαρκή αλληλεπίδραση. Η βιοτική κοινότητα είναι ένα σύνολο οργανισμών, που σχηματίζουν μια ξεχωριστή οικολογική μονάδα, η οποία ορίζεται ως προς τη χλωρίδα, την πανίδα ή το σύνολο και των δύο. Αυτή η κοινότητα ορίζεται ως «βιόκοσμος» [287].

Λόγω αυτής της συνεχούς αλληλεπίδρασης, η ρύπανση ενός οικοσυστήματος μπορεί να συσσωρευτεί στους οργανισμούς του βιόκοσμου. Πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την διερεύνηση της βιοσυσσώρευσης ρύπων σε διάφορους οργανισμούς των οικοσυστημάτων. Υπάρχουν 2 κύριοι τύποι δειγμάτων οργανισμών: Τα υγρά δείγματα (όπως το πλάσμα) και στερεά δείγματα, κυρίως ιστών (όπως μύες, ήπαρ κ.λπ.), τα οποία απαιτούν πολύ διαφορετικές αναλυτικές προσεγγίσεις. Έτσι, σε αυτές τις περιπτώσεις οι αναλύσεις είναι ιδιαίτερα περίπλοκες, καθώς απαιτείται μια σειρά συγκεκριμένων ενεργειών για να ληφθεί ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα (**Εικόνα 4.1**) [288].



Εικόνα 4.1. Βήματα αναλυτικής διαδικασίας για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ρύπων σε οργανισμούς ενός οικοσυστήματος [288].

Λαμβάνοντας υπόψη τις ευρέως ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες των διάφορων ομάδων φαρμακευτικών ουσιών (π.χ. πολικότητα, διαλυτότητα και σταθερότητα), μία από τις κύριες προκλήσεις για την ανάπτυξη μιας λειτουργικής και αξιόπιστης αναλυτικής μεθόδου είναι να επιτευχθεί η αποτελεσματική εκχύλιση των ενώσεων-στόχων [289, 290].

Στην περίπτωση των μη στερεών βιολογικών μητρών, ο κύριος στόχος είναι η προσυγκέντρωση των αναλυτών. Αυτό συνήθως σημαίνει αραίωση, για τη μείωση των παρεμβολών που οφείλονται στη μήτρα, που ακολουθείται από μια προσυγκέντρωση μέσω της χρήσης εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) [291–293]. Μια εναλλακτική τεχνική για την ανάλυση φαρμακευτικών ενώσεων στο πλάσμα, όπως η προπρανολόλη, βασίστηκε στην αραίωση των δειγμάτων με διάλυμα NaOH 0,1% (w/v) και φυγοκέντρωση. Σύμφωνα με δημοσιευμένες αναφορές, αυτή η μέθοδος είχε εξαιρετικά επίπεδα ανάκτησης (περίπου 100%) [294].

Από την άλλη, στην περίπτωση στερεών δειγμάτων, η εκχύλιση φαρμακευτικών ουσιών απαιτεί πιο σύνθετες διαδικασίες. Συνήθως, εφαρμόζονται μέθοδοι όπως επεξεργασία σε υπερήχους [295], εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (MAME) [296], εκχύλιση υγρού υπό πίεση (PLE) [297], φυγοκέντρωση με διαλύτη [298] και περιστροφική εκχύλιση [299].

Η άμεση ανάλυση μετά την εκχύλιση δεν είναι πάντα αξιόπιστη, για τις περιπτώσεις που στόχος είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαρμακευτικών ουσιών στα δείγματα ζώντων οργανισμών. Έτσι, είναι απαραίτητος ο περαιτέρω καθαρισμός για την απομάκρυνση των συνεκχυλισμάτων της μήτρας, τα οποία θα μπορούσαν να αλλοιώσουν το αποτέλεσμα, λειτουργώντας παρεμποδιστικά στην ακριβή ανίχνευση. Η μεγάλη πλειοψηφία των διαδικασιών καθαρισμού βασίζεται σε διεργασίες SPE, καθώς είναι σχετικά γρήγορες, απαιτούν μικρές ποσότητες διαλύτη και μπορούν να προσροφήσουν ενώσεις με πολύ διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, επεκτείνοντας το εύρος εφαρμοσιμότητας τους [300–302].

4.2. Αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ρύπων.

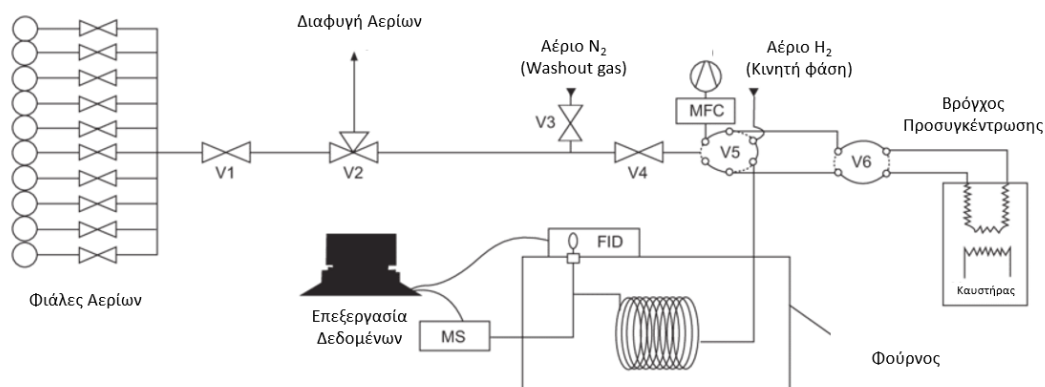
Τις τελευταίες δεκαετίες, στην ανάλυση για τα ίχνη φαρμακευτικών ρύπων έχουν πρωτοστατήσει οι τεχνικές χρωματογραφίας. Η αέρια χρωματογραφία, με διάφορους τύπους ανιχνευτών, συμπεριλαμβανομένου του ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID), του ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) και του ανιχνευτή φασματογράφου μαζών MS, καθώς και η υγρή χρωματογραφία, με μια ευρεία ποικιλία ανιχνευτών, όπως MS, διάταξη φωτοдиодων (DAD), ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους και ανιχνευτές φθορισμού, αποτελούν την αιχμή του δόρατος των αναλύσεων οργανικών ρύπων. Παρακάτω θα παρουσιαστούν οι κυριότερες μέθοδοι που εφαρμόζονται, με βάση τη βιβλιογραφία.

4.2.1. Αέρια χρωματογραφία – GC.

Η αέρια χρωματογραφία αποτελεί σημείο καμπής για την περιβαλλοντική ανάλυση, προσφέροντας υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία στον εντοπισμό, την ποσοτικοποίηση και τον χαρακτηρισμό μιας ευρύτατης σειράς οργανικών ρύπων, σε διάφορες περιβαλλοντικές μήτρες. Η ευελιξία και η σταθερότητα που προσφέρει, σε συνδυασμό με την ικανότητά να ανταποκρίνεται σε περιστάσεις που οι αναλύτες βρίσκονται σε συγκεντρώσεις ίχνους, έχουν καθιερώσει την αέρια χρωματογραφία ως ένα απαραίτητο εργαλείο για την περιβαλλοντική ανάλυση, στην παρακολούθηση και αξιολόγηση υδατικών πόρων. Στην **Εικόνα 4.2** παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής από μια κοινή διάταξη αέριας χρωματογραφίας.

Οι δυνατότητες αναγνώρισης ρύπων της αέριας χρωματογραφίας ενισχύονται σημαντικά όταν αυτή συνδέεται με ανιχνευτή μάζων (MS), μια τεχνική που παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την ταυτοποίηση ενός μορίου. Το σύστημα GC-MS, αφού διαχωρίσει τις ενώσεις (αρχή χρωματογραφίας), αξιοποιεί τον ανιχνευτή MS, που δημιουργεί ένα φάσμα μάζας για κάθε αναλύτη, παρέχοντας μια «υπογραφή» ή «δακτυλικό αποτύπωμα» που επιτρέπει την οριστική ταυτοποίηση του ρύπου.

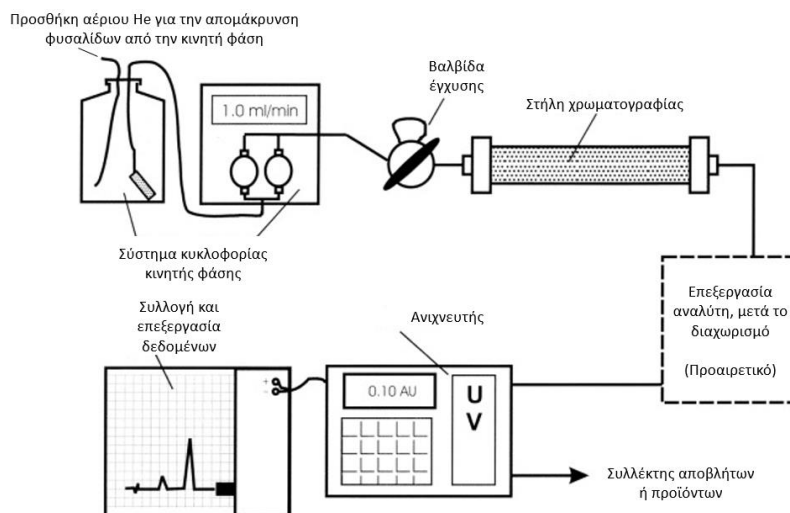
Σημαντικό πλεονέκτημα της αέριας χρωματογραφίας και ειδικότερα του GC-MS είναι το γεγονός ότι δεν επηρεάζεται τόσο πολύ από φαινόμενα επίδρασης της μήτρας, κάτι που παρατηρείται συχνά στην υγρή χρωματογραφία που χρησιμοποιεί συστήματα ESI [303]. Ωστόσο, η αέρια χρωματογραφία παρουσιάζει και ένα σημαντικό μειονέκτημα. Ως επί των πλείστον, περιορίζεται σε ενώσεις που είναι αρκετά πτητικές ώστε να μεταφερθούν στην αέρια φάση ή που μπορούν να μετατραπούν σε πτητικά είδη χωρίς δυσκολία [304, 305].



Εικόνα 4.2. Διάγραμμα ροής αέριας χρωματογραφίας [306].

4.2.2. Υγρή χρωματογραφία – LC.

Τα τελευταία χρόνια, η υγρή χρωματογραφία έχει κερδίσει επίσης σημαντικό έδαφος στον χώρο της αναλυτικής χημείας, λόγω της ευαισθησίας, της σταθερότητας και της απλότητας στη χρήση της. Αυτή η τεχνική διαχωρισμού έχει σημαντικό πλεονέκτημα έναντι της αέριας χρωματογραφίας, λόγω της αποφυγής του σταδίου τροποποίησης των αναλυτών σε πτητικά μόρια. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μπορεί να επηρεαστεί σοβαρά από τη φύση της μήτρας και των παρεμβαλλόμενων ενώσεων που εξάγονται από τα βιολογικά και φυσικά δείγματα, ιδιαίτερα όταν είναι σε συνδυασμό με ανιχνευτή MS [307].



Εικόνα 4.3. Διάγραμμα ροής υγρής χρωματογραφίας [308].

Στην υγρή χρωματογραφία υπάρχουν 2 βασικές κατηγορίες: η χρωματογραφία κανονικής φάσης και η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, η στατική φάση είναι μη πολική και συνήθως πρόκειται για ένα πυριτικό πήκτωμα επικαλυμμένο με μια μη πολική ουσία όπως το οκταδεκυλοσιλάνιο (C18). Η κινητή φάση είναι πολική, συνήθως ένα μείγμα νερού με έναν πολικό οργανικό διαλύτη όπως μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο. Ο μηχανισμός διαχωρισμού της αντίστροφης φάσης βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των πολικών μορίων στο δείγμα και της πολικής κινητής φάσης. Τα πολικά μόρια στο δείγμα έλκονται λιγότερο από τη μη πολική στατική φάση και έλκονται περισσότερο στην πολική κινητή φάση, με αποτέλεσμα την ταχύτερη έκλυση. Λιγότερα πολικά μόρια έλκονται περισσότερο από τη μη πολική στατική φάση και εκλούνται πιο αργά. Από την άλλη, στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, η στατική φάση είναι πολική, συνήθως SiO_2 ή Al_2O_3 . Η κινητή φάση είναι μη πολική, συνήθως ένα μείγμα οργανικών διαλυτών όπως το εξάνιο ή το επτάνιο. Ο μηχανισμός διαχωρισμού αυτής της περίπτωσης είναι παρόμοιος με αυτόν που προαναφέρθηκε και βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των μη πολικών μορίων του δείγματος και της μη πολικής στατικής φάσης. Τα μη πολικά μόρια στο δείγμα συγκρατώνται περισσότερο από τη μη πολική στατική φάση και εκλούνται πιο αργά [309]. Οι περισσότερες αναλύσεις φαρμακευτικών ρύπων από υδατικά δείγματα και από δείγματα ζώντων οργανισμών έχουν διεξαχθεί σε στήλες αντίστροφης φάσης, όπως C8 και C18 [288]. Στην Εικόνα 4.3 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα ροής υγρής χρωματογραφίας.

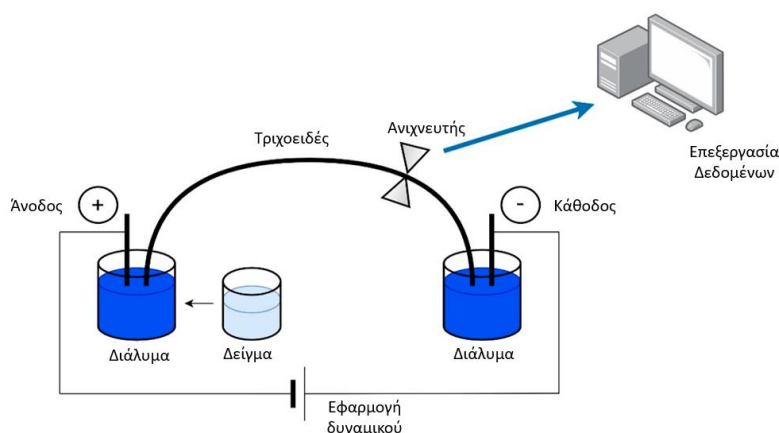
4.2.3. Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση (CE)

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 4.4) έχει αποδειχθεί πως αποτελεί μία φθηνή, αποτελεσματική και γρήγορη μέθοδο διαχωρισμού, που έχει ευρέως συσχετισθεί με τη διερεύνηση των φαρμακευτικών

προϊόντων και ρύπων [310]. Οι αναλύτες που είναι δύσκολο να διαχωρισθούν με γρήγη χρωματογραφία, μπορούν να ανιχνευτούν με χρήση τη τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι εκλεκτική, καθώς ο διαχωρισμός μπορεί να ρυθμιστεί με αλλαγή του pH και της συγκέντρωσης ρυθμιστικού διαλύματος [311].

Οι περιορισμοί ευαισθησίας που δημιουργούνται από μικρά μήκη διαδρομής φωτός και όγκους έγχυσης δείγματος της τάξεως nL, μπορεί πιθανώς να ελέγχονται με on-line τεχνικές προεπεξεργασίας όπως η στοίβαξη και το σκούπισμα. Επιπλέον, είναι δυνατή και η προ-επεξεργασία των δειγμάτων, όπως με εκχυλίσσεις στερεάς φάσης SPME, SPE και LLE [312, 313].

Στη διεθνή βιβλιογραφία εντοπίζονται διάφορες περιπτώσεις, όπου ορισμένες μέθοδοι ηλεκτροφόρησης έχουν αποδειχθεί ότι προσδιορίζουν με μεγάλη αξιοπιστία φαρμακευτικούς ρύπους σε φυσικά επιφανειακά νερά [314], καθώς και στο πόσιμο νερό [315].



Εικόνα 4.4. Εικονική αναπαράσταση τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης [316].

4.3. Μελέτη και ταυτοποίηση προϊόντων μετασχηματισμού.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα προϊόντα μετασχηματισμού αποτελούν ενώσεις που σχηματίζονται μέσω χημικών αντιδράσεων ή αλλαγών μητρικών ενώσεων-ρύπων, που συχνά συναντώνται σε περιβαλλοντικές διεργασίες όπως η αποδόμηση ή ο μεταβολισμός. Η κατανόηση αυτών των προϊόντων είναι ζωτικής σημασίας για την αξιολόγηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων τους, τον προσδιορισμό της τοξικότητάς τους και την κατανόηση της παραμονής τους σε διάφορα συστήματα.

4.3.1. Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (HRMS)

Οι σύγχρονες συμβατικές αναλυτικές μέθοδοι, που χρησιμοποιούνται στα προγράμματα παρακολούθησης περιβαλλοντικής ρύπανσης, απαιτούν τη χρήση προτύπων αναφοράς, για την επιτυχή ταυτοποίηση των αναλυτών. Όμως, στην περίπτωση πολύπλοκων συστημάτων, όπως αυτά που περιέχουν μητρικούς ρύπους και προϊόντα μετασχηματισμού τους, κάτι τέτοιο δεν είναι πάντα εφικτό, καθώς συνήθως οι ενώσεις αυτές δεν είναι γνωστές και πόσο μάλλον διαθέσιμες σε μορφή προτύπων αναφοράς [317]. Οι εξελίξεις στη φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) έχουν προσφέρει νέες προοπτικές για τον εντοπισμό άγνωστων ρύπων, αναδυόμενου χαρακτήρα, καθώς αυτά τα όργανα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση μεταξύ ενώσεων με την ίδια

ονομαστική μάζα, τον προσδιορισμό των στοιχειακών συνθέσεων και τον εντοπισμό αγνώστων. Έτσι, στον τομέα της αναλυτικής χημείας, η HRMS αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση προϊόντων μετασχηματισμού (TPs) σε διάφορους τομείς, όπως ο έλεγχος ρύπανσης περιβάλλοντος [318].

Επιπλέον, η ικανότητα της τεχνολογίας HRMS να χειρίζεται μη στοχευμένη ανάλυση είναι ιδιαίτερα πλεονεκτική στη μελέτη προϊόντων μετασχηματισμού. Σε αντίθεση με την παραδοσιακή στοχευμένη ανάλυση, όπου αναζητούνται συγκεκριμένες ενώσεις, το σύστημα HRMS επιτρέπει την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό άγνωστων ή απροσδόκητων ενώσεων, παρέχοντας μια πιο ολοκληρωμένη άποψη των χημικών μετασχηματισμών [318].

Η ταυτοποίηση χωρίς πρότυπα αναφοράς, χρησιμοποιώντας μόνο τις πληροφορίες της χημικής δομής «a priori», είναι μια προσέγγιση που κερδίζει διαρκώς έδαφος. Ο αριθμός των ουσιών που μπορούν να ελεγχθούν ποιοτικά είναι θεωρητικά απεριόριστος, αλλά μπορεί να περιοριστεί σκόπιμα, εστιάζοντας τη μελέτη στις πιθανές ουσίες που αναμένεται να υπάρχουν στο δείγμα. Η ταυτοποίηση της ένωσης πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας εργαλεία λογισμικού και σύνθετες βάσεις δεδομένων. Μια σύνθετη βάση δεδομένων είναι μια συλλογή χρωματογραφικών και φασματικών πληροφοριών μάζας για ενώσεις που μπορεί να είναι χρήσιμες για την αναζήτηση λογισμικού και την ανάκτηση πληροφοριών για σκοπούς αναγνώρισης. Επί του παρόντος, υπάρχουν περίπου 70 εκατομμύρια χημικές ουσίες καταχωρισμένες στην Υπηρεσία CAS (Chemical Abstracts Service) [317].

Έτσι, ένας έλεγχος, που βασίζεται μόνο στην ακριβή μάζα, θα μπορούσε να οδηγήσει σε έναν μη διαχειρίσιμο αριθμό αποτελεσμάτων, με μεγάλο αριθμό ψευδώς θετικών. Ωστόσο, το σύστημα HRMS παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη δομική διασαφήνιση της ένωσης, όπως ακριβή μάζα, μοτίβο κατακερματισμού (μάζες ιόντων παραγωγής και σχετική αφθονία τους), ισότοπα και άλλα [319].

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν σχετικά παραδείγματα, που αξιοποιώντας τις δυνατότητες της HRMS, μελετούν την διαμόρφωση, τους μηχανισμούς σχηματισμού και τη συμπεριφορά προϊόντων μετασχηματισμού στο περιβάλλον. Χαρακτηριστική είναι μία μελέτη για την ρύπανση από το μυκητοκτόνο Κλιμπαζόλη (Climbazole). Μέσω της κατανόησης της συμπεριφοράς του ρύπου και των προϊόντων μετασχηματισμού του, οι ερευνητές προσπαθούν να ρίξουν φως στο γενικότερο πεδίο της ταυτοποίησης και παρακολούθησης επίμονων, κινητών και τοξικών αναδυόμενων ρύπων [320].

Στην εν λόγω μελέτη ανιχνεύθηκαν 24 προϊόντα οξείδωσης (14 εκ των οποίων δεν είχαν αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία), τα οποία προκύπτουν από πέντε κύριους μηχανισμούς μετασχηματισμού:

- ισομέρεια
- υδροξυλίωση
- αποχλωρίωση
- διάσπαση δεσμού αιθέρα
- διάσπαση δεσμού C-N.

Σε διαφορετική περίπτωση, μελετήθηκε ο ρύπος Ομεπραζόλη (Omeprazole), που αποτελεί ένα από τα παγκοσμίως πιο συχνά συνταγογραφούμενα φάρμακα, για την ανακούφιση από γαστρεντερικές διαταραχές [321]. Οι συγγραφείς αυτής της εργασίας επικεντρώθηκαν στα προϊόντα φωτοχημικού μετασχηματισμού, αναφέροντας όμως πως όταν η Ομεπραζόλη φτάσει στο υδάτινο περιβάλλον, μπορεί να υποστεί διάφορους φυσικούς βιοτικούς και αβιοτικούς μετασχηματισμούς, όπως βιοαποικοδόμηση, υδρόλυση, φωτόλυση κ.λπ.).

4.3.2. Εκτίμηση τοξικότητας και περιβαλλοντικής συμπεριφοράς προϊόντων μετασχηματισμού.

Στον τομέα της περιβαλλοντικής ανάλυσης, η εκτίμηση τοξικότητας των αναλυτών παίζει κομβικό ρόλο. Για το σκοπό αυτό, μεταξύ άλλων μεθόδων εκτίμηση, έχουν αναπτυχθεί υπολογιστικά εργαλεία, όπως το ECOSAR. Το ECOSAR (ECOLOGICAL Structure-Activity Relationship ή στα ελληνικά: Οικολογική σχέση Δομής-Δραστηριότητας) αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την αξιολόγηση της πιθανής τοξικότητας των χημικών ουσιών στους υδρόβιους οργανισμούς. Αναπτύχθηκε από την Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών (USEPA) και αξιοποιεί μια εξελιγμένη προσέγγιση ποσοτικής σχέσης δομής-δραστικότητας (QSAR) για να εξαγάγει προβλέψεις σχετικά με την οξεία (βραχυπρόθεσμη) και τη χρόνια (μακροπρόθεσμη) τοξικότητα μιας ευρείας σειράς οργανικών χημικά σε ψάρια, υδρόβια ασπόνδυλα και υδρόβια φυτά [322].

Η ουσία του ECOSAR έγκειται στην ικανότητά του να δημιουργεί στατιστικές εκτιμήσεις για τη βιολογική δραστηριότητα και τοξικότητα, βάσει της μοριακής δομής μιας χημικής ένωσης. Με την ταξινόμηση των χημικών ουσιών σε καθορισμένες χημικές κατηγορίες και την αναπαράσταση των δομών τους σε τυποποιημένη μορφή, η ECOSAR χρησιμοποιεί μια βιβλιοθήκη εξισώσεων QSAR προσαρμοσμένες σε συγκεκριμένα τελικά σημεία τοξικότητας, όπως η οξεία τοξικότητα στα ψάρια ή η χρόνια τοξικότητα στη Δάφνια [323].

Η ακρίβεια των προβλέψεων του ECOSAR ποικίλλει ανάλογα με διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της χημικής κατηγορίας, του καταληκτικού σημείου τοξικότητας και της διαθεσιμότητας των δεδομένων. Γενικά, η ECOSAR έχει επιδείξει αξιόπαινη αξιοπιστία στην πρόβλεψη της τοξικότητας των χημικών ουσιών, για τους υδρόβιους οργανισμούς. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναγνωρίσουμε ότι αυτές οι προβλέψεις χρησιμεύουν ως εκτιμήσεις και ότι οι πραγματικές τιμές τοξικότητας ενδέχεται να αποκλίνουν από το προβλεπόμενο εύρος [324].

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα στοιχεία από τη μελέτη τοξικότητας των προϊόντων μετασχηματισμού της Κλιμπαζόλης [320]. Συγκεκριμένα, από στατιστικές αναλύσεις με το σύστημα ECOSAR προκύπτει πως, οι ενώσεις που προκύπτουν από έχουν ισομέρεια με το μητρικό ρύπο, παρουσιάζουν αύξηση της τοξικότητάς τους, ενώ προϊόντα υδροξυλίωσης και αποχλωρίωσης εμφανίζουν ελαφρώς μειωμένη τοξικότητα, αλλά σε χρόνια έκθεση η επικινδυνότητα παραμένει σε σταθερά επίπεδα. Από την άλλη, οι περιπτώσεις διάσπασης του δεσμού αιθέρα φαίνεται πως δίνουν προϊόντα με χαμηλότερη τοξικότητα. Τέλος, οι συγγραφείς καταλήγουν πως σε γενικά πλαίσια παρατηρείται μείωση της τοξικότητας κατά τη διάσπαση του μητρικού ρύπου.

Καταλήγοντας, βάσει των όσων αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι σημαντικό να τονιστεί πως οποιοδήποτε σχετικό συμπέρασμα δεν θα ήταν εφικτό, χωρίς την ανάπτυξη μεθόδων που μπορούν να αναλύσουν και να ταυτοποιήσουν άγνωστα προϊόντα μετασχηματισμού.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η σουλφαδοξίνη και γενικότερα τα σουλφοναμίδια, είναι φαρμακευτικές ενώσεις με ευρεία χρήση σε εφαρμογές, όπως η θεραπεία της ελονοσίας. Ωστόσο, η αυξημένη χρήση τέτοιων προϊόντων οδηγεί σε ρύπανση των υδάτων, κατά την απόθεση των αποβλήτων. Από αυτή μπορεί να προκύψουν σημαντικές επιπτώσεις για τη δημόσια υγεία, όπως η ανάπτυξη βακτηριακής ανοσίας στα αντιβιοτικά.

Παρά την εφαρμογή ειδικής κατεργασίας για τη διάσπαση των ρύπων, πολλές φορές αυτοί υφίσταται αλλαγές στη δομή τους, με αποτέλεσμα το σχηματισμό διαφόρων προϊόντων μετασχηματισμού. Οι ενώσεις αυτές ανήκουν στην κατηγορία των αναδυόμενων ρύπων και συνεπώς είναι σημαντικό να αναπτυχθούν αναλυτικές μεθοδολογίες για τον εντοπισμό και την παρακολούθησή τους. Ωστόσο, συνήθως πρόκειται για άγνωστες ενώσεις, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα αναλυτικά πρότυπα, προκειμένου να καταστεί εφικτή η ταυτοποίησή τους, σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα.

Για το λόγο αυτό αποτελεί μονόδρομο η διερεύνηση των μηχανισμών διάσπασης των φαρμακευτικών ενώσεων. Για το σκοπό αυτό, απαιτείται η ανάπτυξη μεθόδων για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό αυτών των προϊόντων μετασχηματισμού.

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μια αναλυτική μέθοδος, υγρής χρωματογραφίας, για τον προσδιορισμό του φαρμακευτικού ρύπου Σουλφαδοξίνη, με χρήση ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (DAD).

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ποικιλία Προηγμένων Οξειδωτικών Μεθόδων Αντιρρύπανσης (POMA), που χρησιμοποιούνται για την περαιτέρω επεξεργασία λυμάτων και την απομάκρυνση αναδυόμενων ρύπων, προκειμένου να παραχθούν σε εργαστηριακή κλίμακα διάφορα προϊόντα μετασχηματισμού του αντιβιοτικού.

Για να καταστεί εφικτή η ταυτοποίηση των προϊόντων μετασχηματισμού του αντιβιοτικού και συνεπώς η μελέτη των μηχανισμών αποικοδόμησης της Σουλφαδοξίνης, αξιοποιήθηκε ένα σύστημα UHPLC-MS/MS Orbitrap-HRMS.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση QSAR, με χρήση του προγράμματος ECOSAR, για να εκτιμηθεί η οικοτοξικότητα των διαφόρων προϊόντων μετασχηματισμού, που σχηματίστηκαν.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. Οργανολογία, Αντιδραστήρια και Εξοπλισμός.

Η Σουλφαδοξίνη αποτέλεσε το επίκεντρο της συγκεκριμένης εργασίας, με το αντιδραστήριο να προμηθεύεται, σε καθαρότητα αναλυτικού προτύπου, από την εταιρεία Supelco, ΗΠΑ.

Η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό σουλφαδοξίνης έγινε με στήλη αντίστροφης φάσης R18. Η στήλη HPLC, που χρησιμοποιήθηκε, ήταν τύπου Shim-pack GIST C18, 5μm, διαστάσεων 150 x 4.0 mm, της εταιρείας Shimadzu, Ιαπωνία.

Η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό προϊόντων μετασχηματισμού, έγινε επίσης σε στήλη τύπου C18. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε σε στήλη τύπου Hypersil GOLD aQ C18, της εταιρείας Thermo Fisher Scientific, Γερμανίας.

Για τη λήψη φάσματος απορρόφησης ακτινοβολίας του αναλύτη χρησιμοποιήθηκε το φωτόμετρο τύπου Pharo 300 Spectroquant, της εταιρείας Merck, Γερμανία (**Εικόνα 5.1**).



Εικόνα 5.1. Φωτόμετρο τύπου Pharo 300 Spectroquant.

Για την μέθοδο προσδιορισμού της Σουλφαδοξίνης χρησιμοποιήθηκε χρωματογράφος HPLC τύπου CBM-20A, της εταιρείας Shimadzu Europa GmbH, Γερμανία (**Εικόνα 5.2**). Το σύστημα χρωματογραφίας διέθετε ανιχνευτή Diode Array.



Εικόνα 5.2. HPLC τύπου CBM-20A, με ανιχνευτή Diode Array, της εταιρείας Shimadzu Europa GmbH.

Για τον προσδιορισμό των προϊόντων μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας, συζευγμένο με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας, τύπου Q Exactive™ Focus Orbitrap LC-MS/MS, της εταιρείας Thermo Fisher Scientific, Γερμανίας (Εικόνα 5.3).



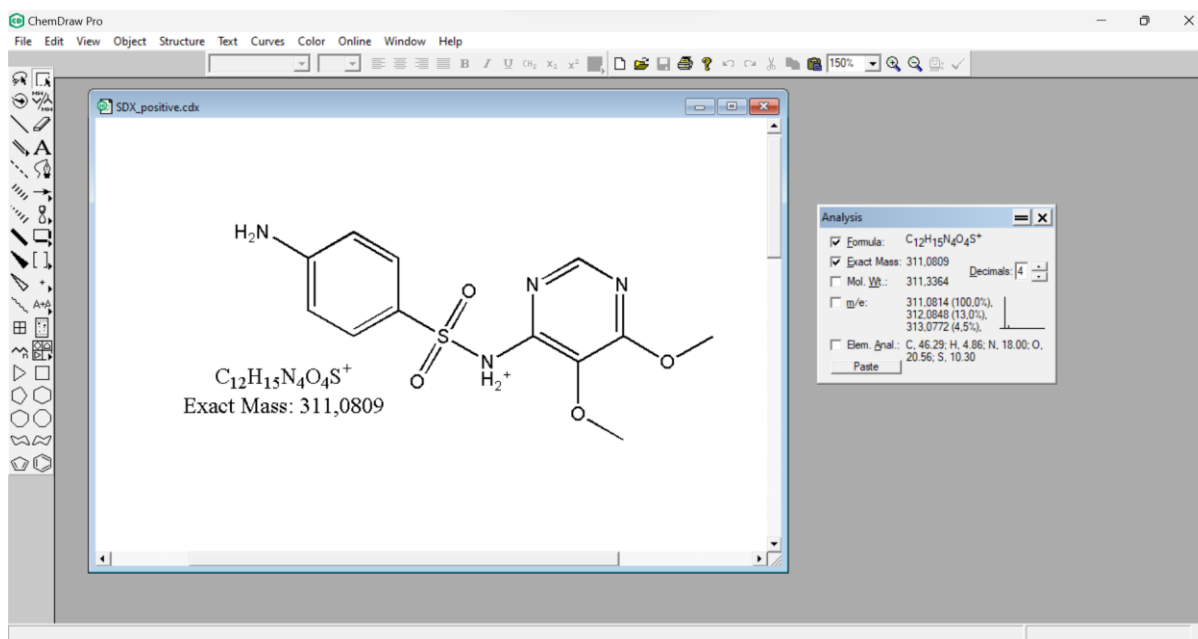
Εικόνα 5.3. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας MS/MS, τύπου Q Exactive™ Focus Orbitrap, της εταιρείας Thermo Fisher Scientific.

Για τον προσδιορισμό του Ολικού Οργανικού Άνθρακα (TOC), χρησιμοποιήθηκε σύστημα TOC-L, εταιρείας Shimadzu Europa GmbH, Γερμανία (Εικόνα 5.4).



Εικόνα 5.4. Σύστημα TOC-L, της εταιρείας Shimadzu Europa GmbH.

Για τον σχεδιασμό των πιθανών προϊόντων μετασχηματισμού, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Chemdraw. Στιγμιότυπο της λειτουργίας του απεικονίζεται στην **Εικόνα 5.5**. Το εν λόγω λογισμικό παρέχει τη δυνατότητα υπολογισμού της ακριβούς θεωρητικής μάζας ενός μορίου, κάτι που συνέβαλε στην ταυτοποίηση των προϊόντων που ανιχνεύθηκαν, από την HRMS.



Εικόνα 5.5. Λογισμικό για το σχεδιασμό προϊόντων μετασχηματισμού, Chemdraw.

Για τις διεργασίες ΠΟΜΑ που περιείχαν υπεριώδη ακτινοβολία (UVA, UVC), χρησιμοποιήθηκε ειδική χειροποίητη διάταξη από ανοξείδωτο ατσάλι (**Εικόνα 5.6**). Το εσωτερικό του μεταλλικού κελύφους, είναι ειδικά σχεδιασμένο για να ανακλά την ακτινοβολία και να περιορίζονται οι ενεργειακές απώλειες. Η κεφαλή της διάταξης έχει 4 υποδοχές για τους λαμπτήρες UV και ειδική οπή για την λήψη δείγματος. Η χωρητικότητα του συστήματος ήταν 2,3 L.



Εικόνα 5.6. Μονάδα φωτοκαταλυτικών και φωτολυτικών Προηγμένων Οξειδωτικών Μεθόδων Αντιρρύπανσης.

Στην **Εικόνα 5.7**, φαίνονται λαμπτήρες τύπου UVA που χρησιμοποιήθηκαν στη διεργασία ετερογενούς φωτοκατάλυσης.

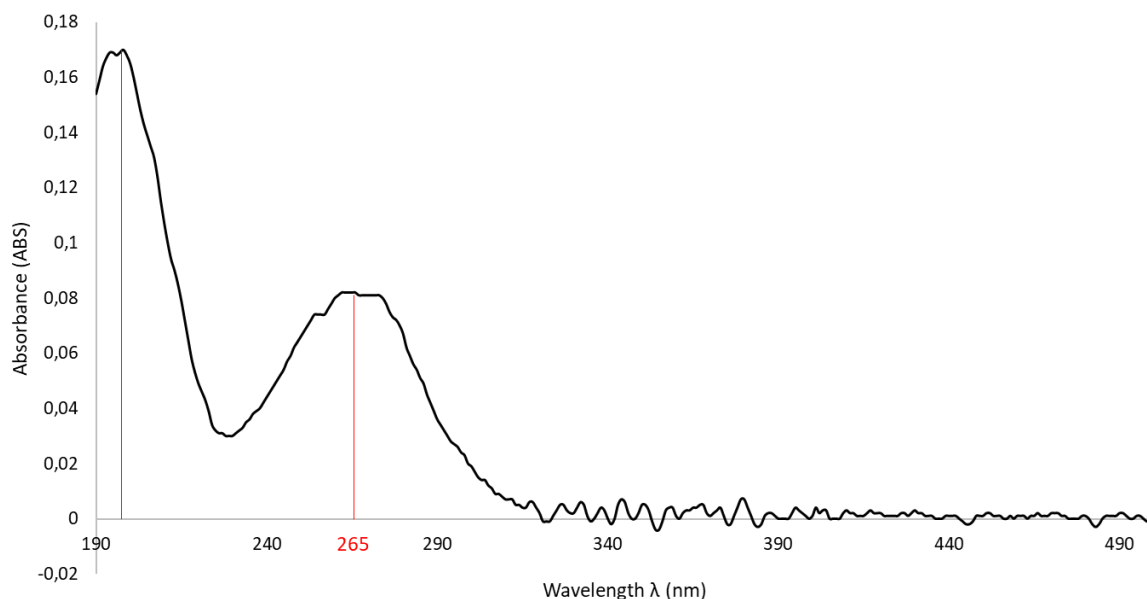


Εικόνα 5.7. Λαμπτήρες UVA.

6. Ανάπτυξη Αναλυτικής Μεθόδου.

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 4.2.2, στις περισσότερες περιπτώσεις φαρμακευτικών αναλύσεων (και ιδίως σουλφοναμινών) εφαρμόζεται χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Κατόπιν βιβλιογραφικής ανασκόπησης, αυτή φάνηκε να αποτελεί την κατάλληλη επιλογή και για την περίπτωση της Σουλφαδοξίνης [325]. Στο παρελθόν είχαν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την ανίχνευση φαρμακευτικών ενώσεων σε περιβάλλον βιολογικών δειγμάτων (πλάσμα αίματος). Ωστόσο, δεδομένου του ότι στόχος ήταν η ανάλυση πολλαπλών γνωστών αναλυτών, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο μήκος κύματος του ανιχνευτή UV (Υπεριώδους). Συγκεκριμένα, αναφέρεται ένα μεγάλο εύρος μηκών κύματος, από 229 nm μέχρι 275 nm [326–331].

Για την ανάπτυξη της συγκεκριμένης μεθόδου, έγινε λήψη φάσματος από φασματοφωτόμετρο. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 6.1**, η μέγιστη απορρόφηση είναι στα 195 nm. Ωστόσο, σε τόσο χαμηλό μήκος κύματος, εμφανίζουν ισχυρή απορρόφηση οι περισσότερες οργανικές ενώσεις, κάτι που θέτει σε κίνδυνο την αξιοπιστία της μεθόδου. Δεδομένου ότι το φάσμα της Σουλφαδοξίνης έδινε και δεύτερη υψηλή κορυφή, επιλέχθηκε εκείνο το μήκος κύματος, με την ακτίνα του ανιχνευτή να ορίζεται στα 265 nm. Έτσι, με ένα σύστημα HPLC-UV καθίσταται δυνατή η παρακολούθηση των επιπέδων συγκέντρωσης της Σουλφαδοξίνης σε υδατικά διαλύματα.



Εικόνα 6.1. Φάσμα απορρόφησης της Σουλφαδοξίνης.

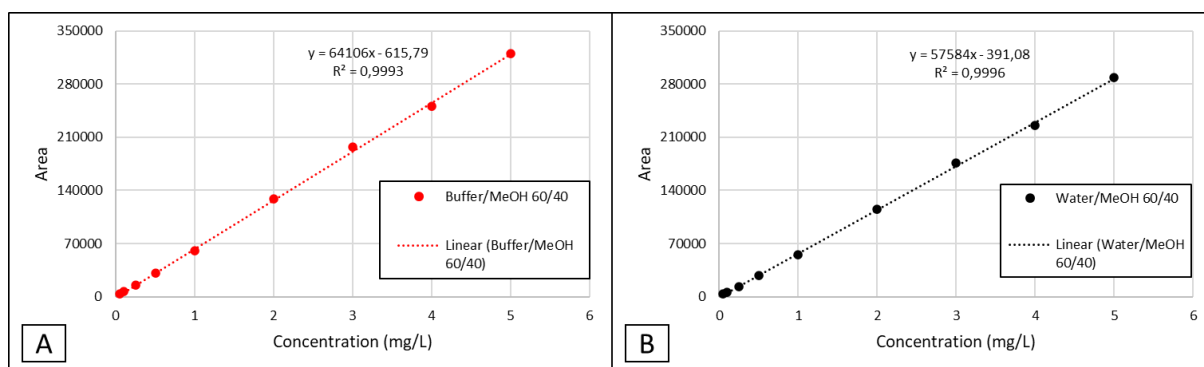
Σχετικά με τις συνθήκες της χρωματογραφίας, η στήλη και η προ-στήλη φυλάσσονταν σε φούρνο του οργάνου, σταθερά στους 40 °C. Στην βιβλιογραφία παρουσιάζεται ποικιλία και σχετικά με τη σύσταση της κινητής φάσης. Συγκεκριμένα, αναφέρονται περιπτώσεις ισοκρατικής ροής υδατικού διαλύματος και κάποιου οργανικού διαλύτη. Για το υδατικό διάλυμα, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις διαλύματος μυρμηκικού οξέος 1%, καθώς και η περίπτωση διαλύματος φωσφορικού άλατος KH_2PO_4 0,05 M. Για οργανικές φάσεις έχουν αναφερθεί το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη [325, 332].

Για την συγκεκριμένη μέθοδο εξετάστηκαν 2 κινητές φάσεις, με ταχύτητα ροής 1 mL/min:

- A. Υδατικό διάλυμα KH_2PO_4 0,1 M και μεθανόλη σε αναλογία 60/40.
- B. Νερό και μεθανόλη 60/40.

Γενικότερα, η χρήση διαλύματος φωσφορικού άλατος βελτιώνει σημαντικά την ποιότητα των αποτελεσμάτων, π.χ. δίνοντας καλύτερο σχήμα στις κορυφές ή επηρεάζοντας τον χρόνο έκλουσης [333]. Ωστόσο, σε διαλύματα που περιέχουν και οργανικό διαλύτη, μειώνεται σημαντικά η διαλυτότητα του άλατος. Έτσι, με την αύξηση της περιεκτικότητας σε μεθανόλη, αυξάνεται η τάση σχηματισμού ιζημάτων μέσα στο σύστημα του χρωματογράφου [334]. Όπως φαίνεται στα σχήματα της **Εικόνας 6.2**, δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων που δίνουν οι 2 κινητές φάσεις. Επιπλέον, δεν υπήρχε διαφορά στον χρόνο έκλουσης του αναλύτη, που και στις 2 περιπτώσεις ήταν στα 2,9 λεπτά. Έτσι, επιλέχθηκε η περίπτωση B, με νερό/μεθανόλη σε αναλογία 60/40 αντίστοιχα και ο χρόνος της ανάλυσης ορίστηκε στα 5 λεπτά. Ο όγκος έγχυσης δείγματος στην κυκλοφορία, ήταν 10 μL . Τα δείγματα δεν πέρασαν από κάποια περίπλοκη προκατεργασία, πριν την ανάλυση, καθώς εφαρμόστηκε μόνο διήθηση με φίλτρο σύριγγας Nylon, με διάμετρο πόρων 0,22 μm . Αυτό αυξάνει την αξία της μεθόδου, καθώς η απλότητά της την καθιστά φιλική προς το χρήστη. Επιπλέον, για τα δείγματα που περιείχαν αιώρημα TiO_2 , προηγήθηκε φυγοκέντρωση 4.000 στροφών ανά λεπτό, για 10 λεπτά.

Όπως θα δούμε παρακάτω, δεν χρειάστηκε περαιτέρω τροποποίηση της μεθόδου, καθώς δεν προέκυπτε συνεπικάλυψη κορυφών, στις οποίες ανήκει αυτή της σουλφαδοξίνης. Σε διαφορετική περίπτωση, θα επιχειρούνταν η μείωση της περιεκτικότητας τη κινητής φάσης σε οργανικό διαλύτη.



Εικόνα 6.2. Καμπύλες βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό Σουλφαδοξίνης. Α) Διάλυμα φωσφορικού άλατος/μεθανόλη 60/40, Β) Νερό/μεθανόλη 60/40.

Όπως φαίνεται στο σχήμα B της **Εικόνας 6.2**, η εξίσωση της καμπύλης είναι:

$$y = 57584x - 391,08$$

Εξίσωση 6.1.

με συντελεστή γραμμικότητας $R^2 = 0,9996$, ενώ το εύρος της καμπύλης είναι 0,05-5 mg/L. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου υπολογίστηκε ότι ήταν ίση με $\%RSD = 1,9 \%$, ενώ η αναπαραγωγιμότητα της ήταν $\%RSD = 3,3 \%$.

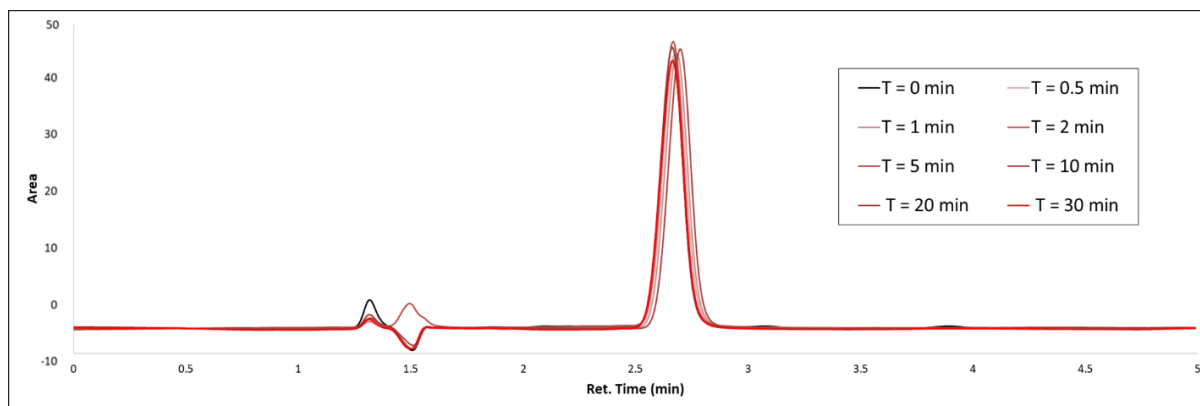
7. Αναλύσεις Δειγμάτων Από ΠΟΜΑ Διαφορετικών Μηχανισμών.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ένα σημαντικό πρόβλημα στις μελέτες των προϊόντων μετασχηματισμού είναι η έλλειψη αναλυτικών προτύπων. Για αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν διεργασίες όπου συνθετικά δείγματα Σουλφαδοξίνης οξειδώθηκαν με χρήση 6 διαφορετικές ΠΟΜΑ. Κατά τη διάρκεια των διεργασιών, λαμβάνονταν δείγματα για ανάλυση με τη μέθοδο HPLC που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 6, προκειμένου να γίνει κατανοητή η κινητική της διάσπασης του αντιβιοτικού. Οι χρόνοι δειγματοληψίας ορίστηκαν στα: $T = 0$ λεπτά, $T = 0,5$ λεπτό, $T = 1$ λεπτό, $T = 2$ λεπτά, $T = 5$ λεπτά, $T = 10$ λεπτά, $T = 20$ λεπτά, $T = 30$ λεπτά. Στην έναρξη και τη λήξη της κάθε διεργασίας, έγινε και μέτρηση της συγκέντρωσης Ολικού Οργανικού Άνθρακα (Total Organic Carbon – TOC). Οι συγκεκριμένες μετρήσεις έγιναν προκειμένου να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τα επίπεδα ανοργανοποίησης. Στις περιπτώσεις που δεν παρουσιαζόταν σημαντική απομάκρυνση οργανικού φορτίου, υπό τη μορφή αερίου CO_2 , θα μπορούσαν να εξαχθούν συμπεράσματα πως στο διάλυμα παραμένουν σημαντικές συγκεντρώσεις από προϊόντα μετασχηματισμού της Σουλφαδοξίνης.

7.1. Προσθήκη H_2O_2 .

Για το σκοπό αυτής της διεργασίας προετοιμάστηκε διάλυμα Σουλφαδοξίνης, με συγκέντρωση 5 mg/L. Ο χρόνος πειράματος ορίστηκε στα 30 λεπτά από τη στιγμή της προσθήκης του αντιδραστηρίου H_2O_2 , ενώ το διάλυμα βρισκόταν υπό ανάδευση (300 στροφές το λεπτό) σε όλη τη διάρκεια της διεργασίας.

Στην **Εικόνα 7.1** παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων από κάθε χρονική στιγμή.



Εικόνα 7.1. Χρωματογραφήματα για την κινητική της διεργασίας με H_2O_2 , για την διάσπαση Σουλφαδοξίνης.

Όπως είναι εμφανές, δεν υπήρχε κάποια αντίδραση στο σύστημα, με αποτέλεσμα να μην οξειδωθεί ο ρύπος (Απομάκρυνση Σουλφαδοξίνης: 1%). Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς όπως αναφέρθηκε και στην Ενότητα 3.2, το H_2O_2 δεν αποτελεί καλό οξειδωτικό από μόνο του. Η κινητική της διεργασίας συνοψίζεται στον **Πίνακα 7.1**.

Πίνακας 7.1. Κινητική διεργασίας με H_2O_2 .

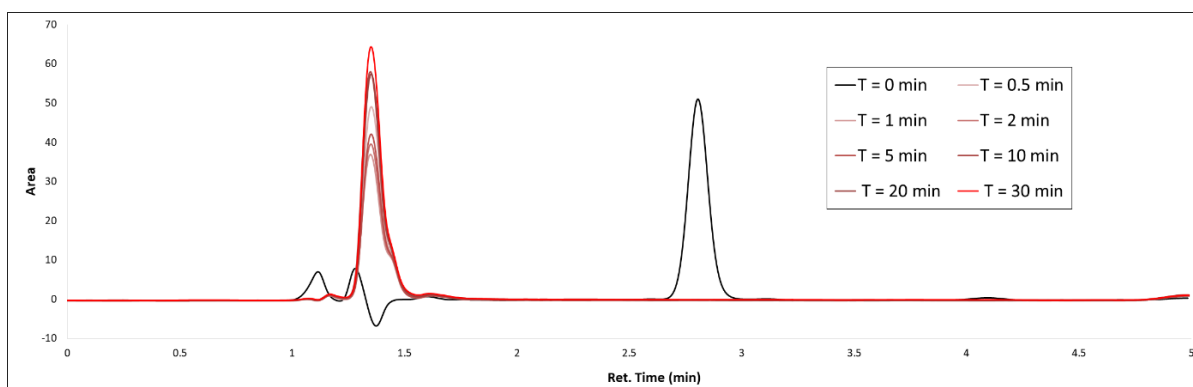
Χρόνος (Λεπτά)	0	0,5	1	2	5	10	20	30
Επίπεδα Σουλφαδοξίνης	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%

Για το συγκεκριμένο πείραμα δεν έγιναν μετρήσεις TOC, καθώς η απομάκρυνση της Σουλφαδοξίνης ήταν στα όρια του στατιστικού λάθους και συνεπώς, δεν αναμενόταν να ληφθούν χρήσιμες πληροφορίες αναφορικά με την ανοργανοποίηση.

7.2. Fenton.

Για το σκοπό της διεργασίας Fenton προετοιμάστηκε διάλυμα Σουλφαδοξίνης, με συγκέντρωση 5 mg/L. Επιπλέον, στο διάλυμα υπήρχε διαλυμένος ο καταλύτης Fe^{2+} , υπό τη μορφή άλατος FeSO_4 , συγκέντρωσης 1 mM (1,52 mg/L FeSO_4). Το διάλυμα βρισκόταν υπό ανάδευση σε όλη τη διάρκεια της διεργασίας (300 στροφές το λεπτό), με το πείραμα να ξεκινάει από τη στιγμή προσθήκης του αντιδραστήριου H_2O_2 . Επιπλέον, έγινε μέτρηση του pH, το οποίο, τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος της διεργασίας, βρέθηκε να είναι $\text{pH} \leq 3$. Σε διαφορετική περίπτωση θα έπρεπε να ρυθμιστεί με H_2SO_4 , για να αποφευχθεί η καταβύθιση του Fe^{2+} [335].

Στην **Εικόνα 7.2** παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων από κάθε χρονική στιγμή.



Εικόνα 7.2. Χρωματογραφήματα για την κινητική της διεργασίας με Fenton, για την διάσπαση Σουλφαδοξίνης.

Στη συγκεκριμένη διεργασία ήταν εμφανές πως υπήρξε ενεργός μηχανισμός οξείδωσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων, η Σουλφαδοξίνη φάνηκε να διασπάται πλήρως από τα πρώτα 30 δευτερόλεπτα. Δεδομένου πως από τη στιγμή της δειγματοληψίας, μέχρι την ανάλυση, μεσολαβούσε αρκετός χρόνος, η αρχική υπόθεση ήταν πως η αντίδραση συνέχιζε εντός των φιαλιδίων HPLC και συνεπώς, ότι τα παραπάνω αποτελέσματα ήταν εσφαλμένα. Για αυτό το λόγο, πραγματοποιήθηκε επανάληψη του πειράματος με χρήση μικροποσότητας του ενζύμου Καταλάση σε κάθε δείγμα που προοριζόταν για ανάλυση. Η Καταλάση (Catalase) είναι ένα ένζυμο που συναντάται σε πολλούς οργανισμούς που αναπτύσσονται σε ένα περιβάλλον με οξυγόνο. Μια σπουδαία ιδιότητά του είναι να αντιδράει ταχύτατα με το H_2O_2 , δίνοντας οξυγόνο και νερό [336, 337]. Με αυτόν τον τρόπο, θα εξασφαλιζόταν ο τερματισμός της αντίδρασης μετά τη δειγματοληψία, απομακρύνοντας την πηγή των οξειδωτικών ριζών. Από την επανάληψη του πειράματος προέκυψε ακριβώς η ίδια συμπεριφορά, γεγονός που επιβεβαίωσε την ταχύτητα της αντίδρασης Fenton.

Στην **Εικόνα 7.2**, φαίνονται χρωματογραφήματα με έντονες κορυφές μέχρι και τα 30 λεπτά διεργασίας, οι οποίες αποδίδονται σε ενώσεις προϊόντων της οξείδωσης. Η κινητική της διεργασίας συνοψίζεται στον **Πίνακα 7.2**.

Πίνακας 7.2. Κινητική διεργασίας Fenton.

Χρόνος (Λεπτά)	0	0,5	1	2	5	10	20	30
Επίπεδα Σουλφαδοξίνης	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Οι μετρήσεις TOC έδειξαν πως οι ανοργανοποίηση έφτανε μόλις μέχρι το ποσοστό του 28%, γεγονός που σημαίνει πως η υπόλοιπη ποσότητα του αντιβιοτικού παραμένει στο διάλυμα υπό τη μορφή προϊόντων μετασχηματισμού.

7.3. Φωτόλυση με ακτινοβολία UVC.

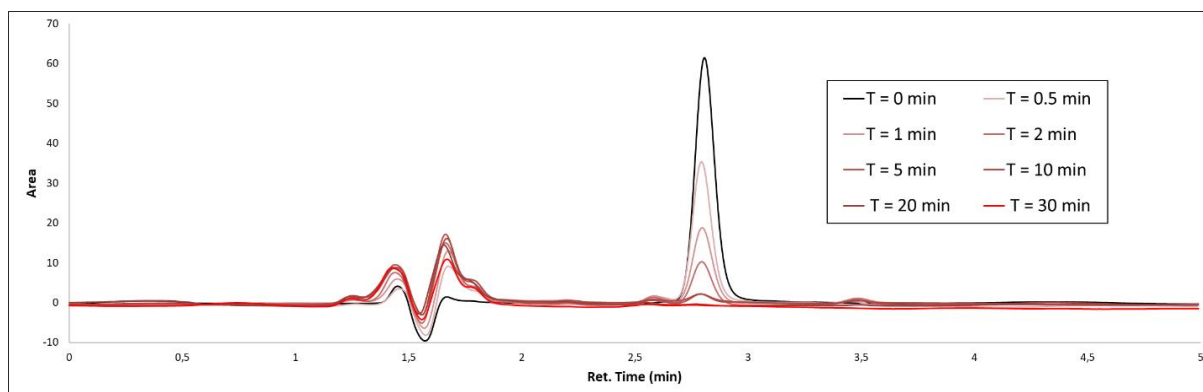
Για τη συγκεκριμένη διεργασία παρασκευάστηκε μόνο ένα διάλυμα Σουλφαδοξίνης, με συγκέντρωση 5 mg/L και δεν προστέθηκε κάποιο άλλο αντιδραστήριο. Το διάλυμα βρισκόταν σε ανάδευση (300 στροφές το λεπτό) καθόλη τη διάρκεια του πειράματος, το οποίο ξεκινούσε από την ενεργοποίηση των λαμπτήρων UVC.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 7.3**, όπου παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων από κάθε χρονική στιγμή, υπήρξε σταδιακή διάσπαση της Σουλφαδοξίνης, καταλήγοντας σε πλήρη απομάκρυνση του ρύπου, στο τέλος της διεργασίας. Κοντά στο 1,5 λεπτό των χρωματογραφημάτων παρατηρούνται κορυφές που αποδίδονται σε προϊόντα μετασχηματισμού. Η κινητική της διεργασίας συνοψίζεται στον **Πίνακα 7.3**.

Πίνακας 7.3. Κινητική διεργασίας με UVC.

Χρόνος (Λεπτά)	0	0,5	1	2	5	10	20	30
Επίπεδα Σουλφαδοξίνης	100%	54%	30%	18%	4%	3%	0%	0%

Από τις αναλύσεις TOC προκύπτει πως η ανοργανοποίηση έφτανε το 41%.



Εικόνα 7.3. Χρωματογραφήματα για την κινητική της διεργασίας με UVC, για την διάσπαση Σουλφαδοξίνης.

7.4. UVC – H₂O₂.

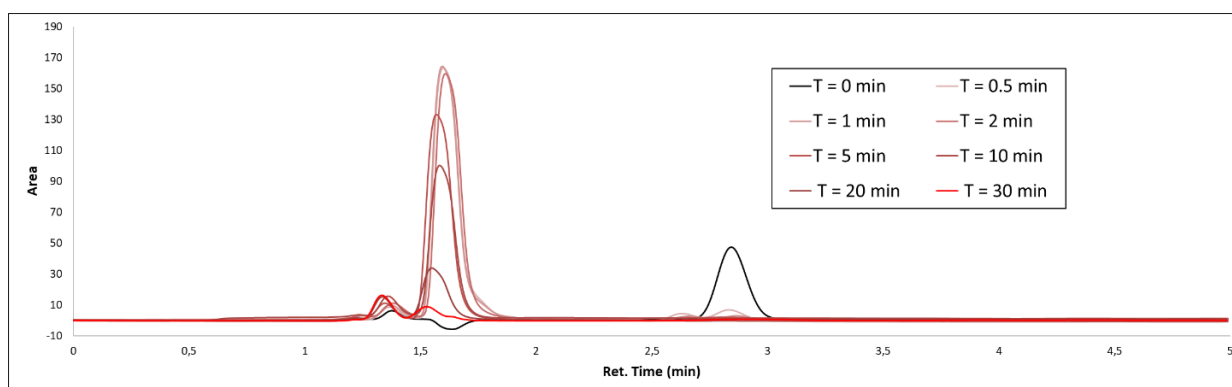
Αυτό το πείραμα αποτελούσε συνέχεια της διεργασίας που περιεγράφηκε στην Ενότητα 7.3, με διαφορά στην προσθήκη αντιδραστήριου H₂O₂. Όπως έδειξαν τα αποτελέσματα του πειράματος που περιγράφεται στην Ενότητα 7.1, το H₂O₂ δεν προκαλεί κάποιο μηχανισμό οξείδωσης από μόνοο. Έτσι,

ως εκκίνηση του πειράματος θεωρήθηκε η στιγμή της ενεργοποίησης των λαμπτήρων UVC. Όπως και στα προηγούμενα πειράματα, το διάλυμα (Σουλφαδοξίνη 5 mg/L) παρέμεινε υπό διαρκή ανάδευση (300 στροφές το λεπτό) καθόλη τη διάρκεια του πειράματος.

Στην **Εικόνα 7.4**, παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων από κάθε στιγμή δειγματοληψίας. Σε σχέση με την περίπτωση της απλής φωτόλυσης, είναι εμφανές πως η κινητική διάσπασης της Σουλφαδοξίνης είναι πολύ πιο γρήγορη. Η κινητική της διεργασίας συνοψίζεται στον **Πίνακα 7.4**.

Πίνακας 7.4. Κινητική διεργασίας με UVC/H₂O₂.

Χρόνος (Λεπτά)	0	0,5	1	2	5	10	20	30
Επίπεδα Σουλφαδοξίνης	100%	16%	7%	0%	0%	0%	0%	0%



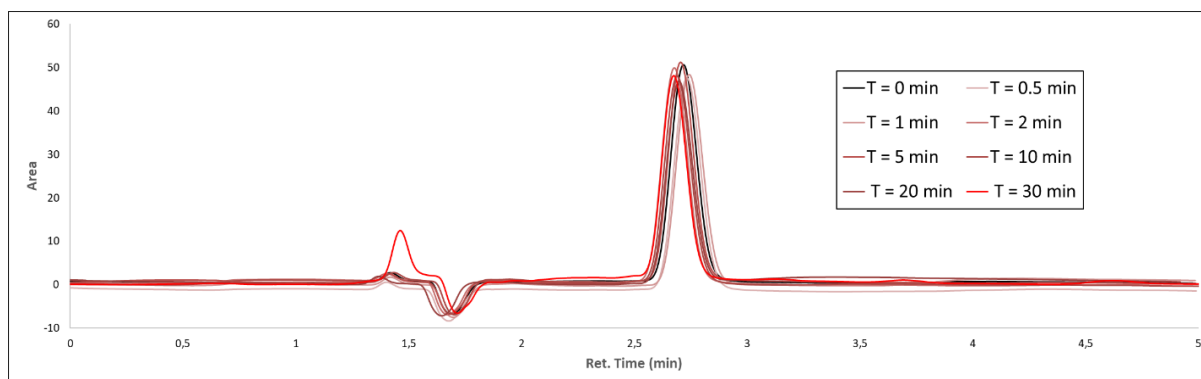
Εικόνα 7.4. Χρωματογραφήματα για την κινητική της διεργασίας με UVC – H₂O₂, για την διάσπαση Σουλφαδοξίνης.

Στο 1,5 λεπτό εμφανίζεται μία έντονη κορυφή που μειώνεται με εκθετικό ρυθμό. Αυτό, σημαίνει πως, πιθανότατα λόγω των πολλαπλών ενεργών μηχανισμών, αρχικά προκύπτουν ένα ή περισσότερα προϊόντα μετασχηματισμού, που οξειδώνονται περαιτέρω με το πέρασμα του χρόνου. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως παρά τη σημαντική επιτάχυνση της κινητικής, δεν ακολουθήθηκε αυτό το μοτίβο και στην ανοργανοποίηση, με την πτώση του TOC να φτάνει το 42%. Συνεπώς, οι επιπρόσθετοι μηχανισμοί (όπως η φωτόλυση του H₂O₂), δεν οδηγούν σε απομάκρυνση του οργανικού φορτίου και των προϊόντων μετασχηματισμού.

7.5. Φωτόλυση με ακτινοβολία UVA.

Επιχειρήθηκε μεταξύ άλλων και μία φωτολυτική διεργασία, με ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος. Την έναρξη της διεργασίας σηματοδοτούσε η ενεργοποίηση των λαμπτήρων και όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενα πειράματα, η ανάδευση ήταν 300 στροφές ανά λεπτό και η συγκέντρωση του διαλύματος 5 mg/L. Στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διάσπαση Σουλφαδοξίνης, με την πτώση της συγκέντρωσής της να περιορίζεται στο 14%. Αυτό ήταν αναμενόμενο, δεδομένης της φύσης των οργανικών ενώσεων, που τείνουν να απορροφούν εντονότερα την ακτινοβολία χαμηλότερων μηκών κύματος (π.χ. UVC).

Τα χρωματογραφήματα από την κινητική της διεργασίας αποτυπώνονται στην **Εικόνα 7.5**.



Εικόνα 7.5. Χρωματογραφήματα για την κινητική της διεργασίας με UVA, για την διάσπαση Σουλφαδοξίνης.

Λόγω της πολύ χαμηλής διάσπασης του αντιβιοτικού, δεν θεωρήθηκε σκόπιμη η ανάλυση TOC, για την εκτίμηση της ανοργανοποίησης, καθώς αναμενόταν να είναι μηδαμινή. Η κινητική της διεργασίας συνοψίζεται στον **Πίνακα 7.5**.

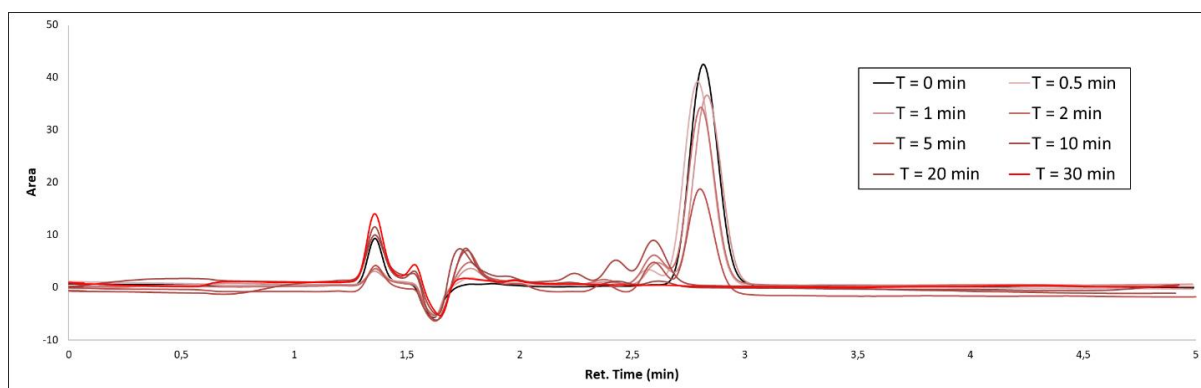
Πίνακας 7.5. Κινητική διεργασίας με UVA.

Χρόνος (Λεπτά)	0	0,5	1	2	5	10	20	30
Επίπεδα Σουλφαδοξίνης	100%	100%	99%	98%	97%	94%	93%	86%

7.6. Ετερογενής φωτοκατάλυση με TiO_2 .

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η ακτινοβολία UVA δεν μπόρεσε να φωτολύσει τον οργανικό ρύπο σε σημαντικό βαθμό. Ωστόσο, έχει την ιδιότητα να διεγείρει την επιφάνεια ενός εξαιρετικού καταλύτη, του TiO_2 . Έτσι, παρασκευάστηκε διάλυμα που περιείχε Σουλφαδοξίνη συγκέντρωσης 5 mg/L και TiO_2 συγκέντρωσης 100 mg/L. Στη συγκεκριμένη διεργασία ήταν πολύ σημαντικό να παραμείνει ο καταλύτης σε κατάσταση αιωρήματος και για αυτό τον λόγο, εφαρμόστηκε έντονη ανάδευση (700 στροφές ανά λεπτό), καθόλη τη διάρκεια της.

Στην **Εικόνα 7.6** παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα από διαφορετικούς χρόνους της διεργασίας. Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό από το πλήθος των άγνωστων κορυφών, αυτός ο μηχανισμός οξείδωσης γέννησε μεγάλη ποικιλία προϊόντων μετασχηματισμού.



Εικόνα 7.6. Χρωματογραφήματα για την κινητική της διεργασίας με UVA/ TiO_2 , για την διάσπαση Σουλφαδοξίνης.

Ωστόσο, όπως φαίνεται από το χρωματογράφημα των 30 λεπτών, δεν υπάρχει μόνο πλήρης διάσπαση της Σουλφαδοξίνης, αλλά και σημαντική μείωση των προϊόντων μετασχηματισμού, καθώς δεν

εμφανίζονται οι σχετικές κορυφές. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα των αναλύσεων TOC, με το ποσοστό απομάκρυνσης οργανικού άνθρακα να ανέρχεται στο 53%, στα 30 λεπτά διεργασίας. Η κινητική της διεργασίας συνοψίζεται στον **Πίνακα 7.6**.

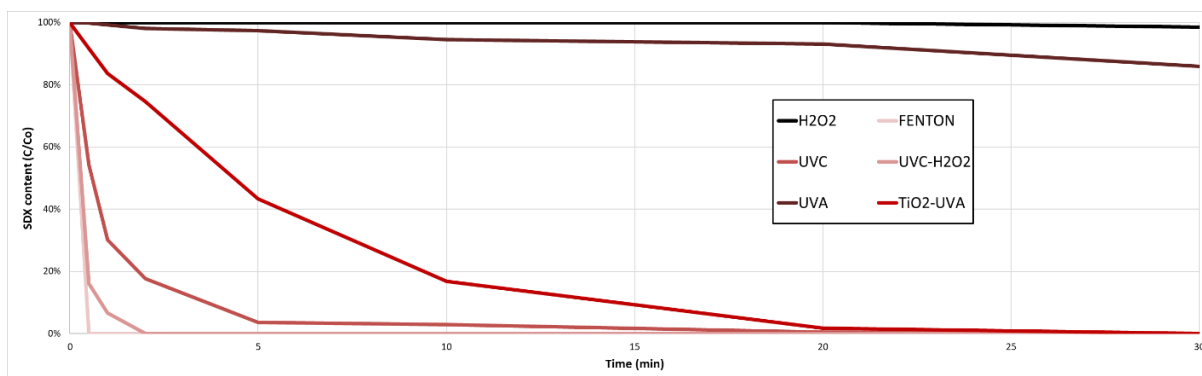
Πίνακας 7.6. Κινητική διεργασίας Ετερογενούς Φωτοκατάλυσης.

Χρόνος (Λεπτά)	0	0,5	1	2	5	10	20	30
Επίπεδα Σουλφαδοξίνης	100%	92%	84%	75%	43%	17%	2%	0%

7.7. Σύγκριση ΠΟΜΑ.

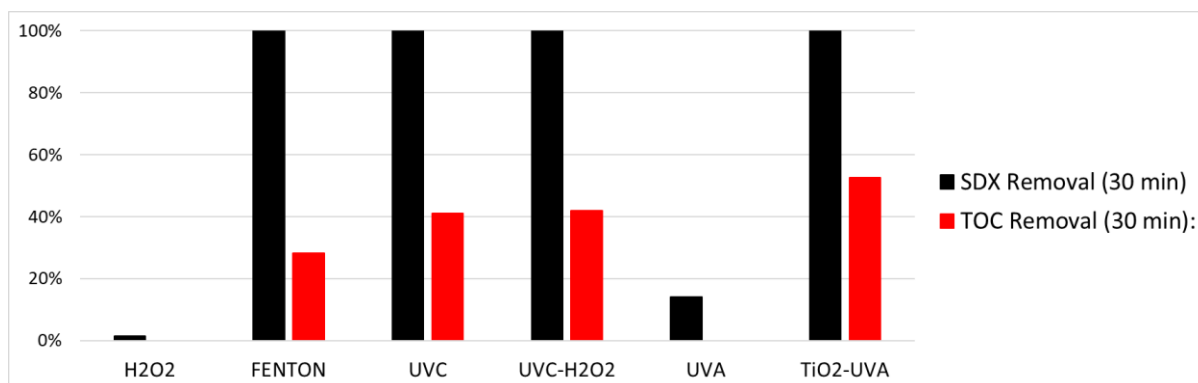
Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν στο παρόν κεφάλαιο, η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε δεν προσφέρει μόνο τη δυνατότητα παρακολούθησης των επιπέδων Σουλφαδοξίνης σε υδατικά δείγματα, αλλά και ένα μέσο αξιολόγησης και κατανόησης των μηχανισμών οξείδωσης διαφορετικών ΠΟΜΑ. Σε αυτήν την ενότητα λοιπόν, θα γίνει μία σύνοψη των παραπάνω αποτελεσμάτων, με στόχο να συγκριθούν οι διαφορετικές διεργασίες.

Στο διάγραμμα της **Εικόνας 7.7**, παρουσιάζεται μία γραφική αναπαράσταση των κινητικών που αναλύθηκαν παραπάνω, βάσει των αποτελεσμάτων της μεθόδου που αναπτύχθηκε.



Εικόνα 7.7. Γραφική αναπαράσταση των κινητικών διάσπασης Σουλφαδοξίνης, από διαφορετικές ΠΟΜΑ.

Εκ πρώτης όψεως, φαίνεται πως μέθοδοι, όπως η Fenton, παρουσιάζουν την βέλτιστη συμπεριφορά. Ωστόσο, όπως έχει εξηγηθεί, καταλυτικός παράγοντας στην αντιρρυπαντική πρακτική είναι η αποφυγή απελευθέρωσης οποιουδήποτε ρύπου στο περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένων και των προϊόντων μετασχηματισμού. Έτσι, αποκτά ιδιαίτερη αξία το σύνολο των πληροφοριών που συνοψίζει το γράφημα της **Εικόνας 7.8**, όπου φαίνεται πως η Ετερογενής Φωτοκατάλυση, αν και δεν παρουσιάζει την ταχύτερη διάσπαση της Σουλφαδοξίνης, αποτελεί την βέλτιστη από τις ΠΟΜΑ που μελετήθηκαν, καθώς εμφανίζει την καλύτερη ανοργανοποίηση.



Εικόνα 7.8. Γράφημα απομάκρυνσης Σουλφαδοξίνης και Ολικού Οργανικού Άνθρακα, από διαφορετικές ΠΟΜΑ.

8. Προσδιορισμός Προϊόντων Μετασχηματισμού.

Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την αναλυτική μέθοδο που αναπτύχθηκε, επιβεβαίωναν την παρουσία προϊόντων μετασχηματισμού, που όπως εξηγήθηκε στο θεωρητικό μέρος, αποτελούν αναδυόμενους ρύπους. Ωστόσο, για να είναι ολοκληρωμένη μία μελέτη, είναι απαραίτητη η ταυτοποίηση αυτών των ενώσεων.

Αυτό καθίσταται δυνατό με την Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (HRMS). Συγκεκριμένα, για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα όργανο UHPLC–Orbitrap MS. Σχετικά με τη λειτουργία του, η στήλη και η προ-στήλη διατηρήθηκαν στους 40 °C, μέσα στο φούρνο του οργάνου και εφαρμόστηκε με σταθερή ροή 0,2 mL/min. Η κινητή φάση αποτελούνταν από νερό (Α) και μεθανόλη (Β) και τα δύο οξιζισμένα με 0,1% (v/v) μυρμηκικό οξύ. Η εσωτερική θερμοκρασία του αυτόματου δειγματολήπτη ορίστηκε στους 10 °C. Ο όγκος της ένεσης ήταν 5 µL και το πρόγραμμα βαθμότης έκλουσης ήταν: 0 min - 10% Β, 4 λεπτά - 60% Β, 8 λεπτά - 30% Β, 11 λεπτά - 100% Β, 13 λεπτά - 10% Β, 15 λεπτά - 10% Β.

Το HESI-Orbitrap MS λειτουργούσε με θετικό ιοντισμό μορίων με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization ESI), σε ανάλυση 70.000 για MS πλήρους σάρωσης (FS) και 17.500 για λήψη μάζας εξαρτώμενης από δεδομένα (ddMS2). Το εύρος μάζας ορίστηκε στα 100–1000 Da και 50–900 Da, αντίστοιχα για κάθε λειτουργία. Για τη διαδικασία ημιποσοτικού προσδιορισμού των ενώσεων-στόχων, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό λειτουργίας του οργάνου και ύποπτης ανάλυσης XCalibur 4.1, TraceFinder 4.1 EFS και Compound Discoverer 3.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Όπως και στην περίπτωση του HPLC-DAD, τα δείγματα περνούσαν από φίλτρο σύριγγας Nylon με διάμετρο πόρων 0,22 µm, ενώ έγιναν ανάλογες φυγοκεντρήσεις όπου ήταν απαραίτητο. Για τις αναλύσεις προϊόντων μετασχηματισμού επιλέχθηκαν δείγματα από τα μέσα των οξειδωτικών διεργασιών και γινόταν αραίωση ώστε η συγκέντρωση σουλφαδοξίνης να μην υπερβαίνει το 1 mg/L.

8.1. Ταυτοποίηση Σουλφαδοξίνης

Πρώτο βήμα της ανάλυσης, ήταν η ταυτοποίηση της Σουλφαδοξίνης και των θραυσμάτων της από το σύστημα Orbitrap. Στον **Πίνακα 8.1** αναγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα και οι μάζες των σχετικών θραυσμάτων, ενώ στην **Εικόνα 8.1** παρουσιάζεται η δομή τους, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο προέκυψαν μέσα στο όργανο. Στην **Εικόνα 8.2** εμφανίζεται το σήμα που λήφθηκε από το όργανο, με το φάσμα μαζών των θραυσμάτων Σουλφαδοξίνης.

Πίνακας 8.1. Αποτελέσματα θραυσμάτων Σουλφαδοξίνης από ανάλυση Orbitrap – HRMS.

TP_XX	t _R (min)	Molecular Formula (neutral molecule)	Ionization Mode	Adduct Ion	Elemental Composition (m/z)	Theor. Mass	Exp. Mass	RDB	Δ (ppm)
Sulfadoxine	1,16	C₁₂H₁₄N₄O₄S	ESI+	[M+H]	[C₁₂H₁₅N₄O₄S]⁺	311,0809	311,0807	7,5	-1,100
Fragment 1		C ₁₀ H ₁₅ NO ₃ S	ESI+	[M+H]	[C ₁₀ H ₁₆ NO ₃ S] ⁺	230,0845	230,0803	3,5	-4,261
Fragment 2		C ₅ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	ESI+	[M+H]	[C ₅ H ₁₄ N ₃ O ₄ S] ⁺	212,0700	212,0686	0,5	-1,333
Fragment 3		C ₄ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	ESI+	[M+H]	[C ₄ H ₁₄ N ₃ O ₃ S] ⁺	184,0750	184,0742	-0,5	-0,839
Fragment 4		C ₆ H ₇ N ₃ O ₂	ESI+	[M+H]	[C ₆ H ₈ N ₃ O ₂] ⁺	154,0611	154,6110	4,5	-0,003
Fragment 5		C ₅ H ₅ N ₃ O ₂	ESI+	[M+H]	[C ₅ H ₆ N ₃ O ₂] ⁺	140,0455	140,0454	4,5	-0,063
Fragment 6		C ₄ H ₅ N ₃ O	ESI+	[M+H]	[C ₄ H ₆ N ₃ O] ⁺	112,0505	112,0508	3,5	0,332
Fragment 7		C ₆ H ₅ N	ESI+	[M+H]	[C ₆ H ₆ N] ⁺	92,0495	92,0500	4,5	0,564

Fragment 8

C_5H_5N

ESI+

$[M+H]^+$

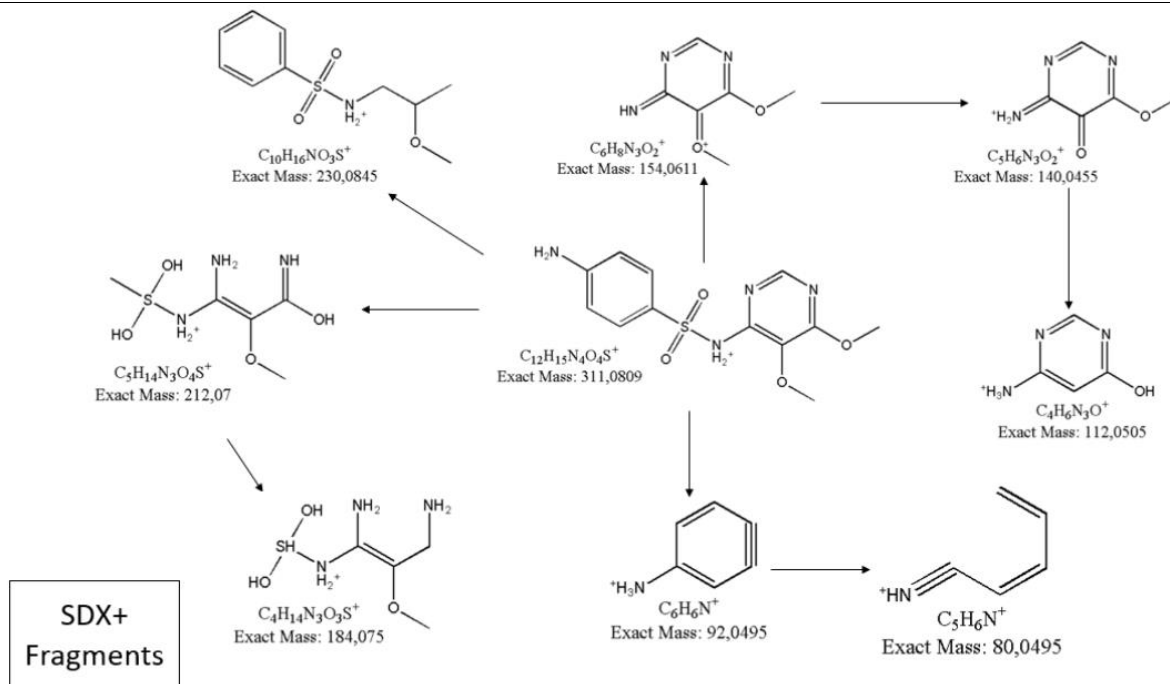
$[C_5H_6N]^+$

80,0495

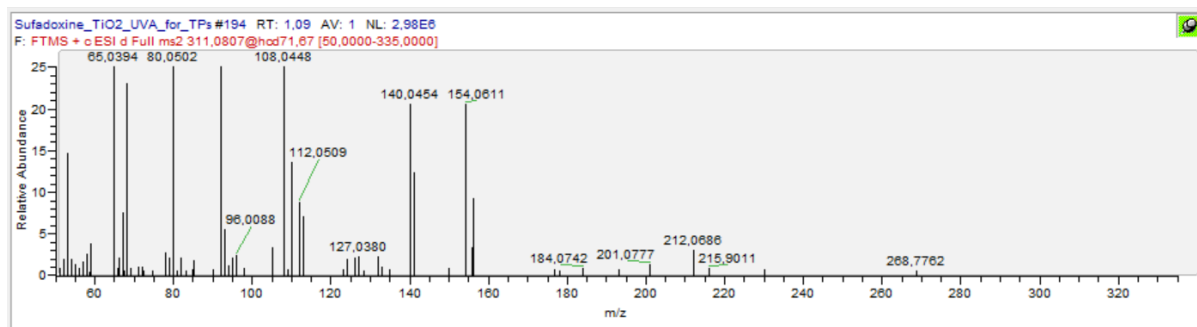
80,0502

3,5

0,684



Εικόνα 8.1. Θραύσματα Σουλφαδοξίνης που ανιχνεύτηκαν με χρήση Orbitrap - HRMS.



Εικόνα 8.2. Φάσμα μαζών από θραύσματα Σουλφαδοξίνης.

Από τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στην **Εικόνα 8.1** προκύπτουν ορισμένοι μηχανισμοί με τους οποίους δημιουργούνται θραύσματα στο Orbitrap. Γενικότερα, ο κατακερματισμός των ενώσεων φαίνεται να επικεντρώνεται στους δεσμούς που συμμετέχουν άτομα S, N και O. Συγκεκριμένα, το θραύσμα μάζας 154,0611 m/z, και συνεπώς τα θραύσματα που προκύπτουν από αυτό, όπως το 140,0455 m/z και το 112,0505 m/z, προέρχονται από τη λύση του δεσμού S-N. Τα 2 θυγατρικά θραύσματα προκύπτουν κατόπιν λύσης δεσμών O-C. Το θραύσμα 230,0845 m/z προκύπτει από τη λύση δεσμών N-C του δακτυλίου και του αμινικού άκρου και O-C του ενός από τους 2 αιθέρες. Το θραύσμα 92,0496 προκύπτει με τη λύση του δεσμού S-C και την απομάκρυνση 2 H, για τη δημιουργία τριπλού δεσμού. Στη συνέχεια, το θυγατρικό του μόριο, με μάζα 80,0495 m/z, προκύπτει κατόπιν απομάκρυνσης ενός ατόμου C. Τέλος, το θραύσμα 212,0700 m/z προκύπτει κατόπιν λύσης δεσμών C-C του βενζολικού δακτυλίου και απομάκρυνσης ενός άνθρακα της διαζίνης. Το θυγατρικό θραύσμα 184,0750 m/z προκύπτει με την απομάκρυνση του C που ενώνεται με το S και την απομάκρυνση ενός O.

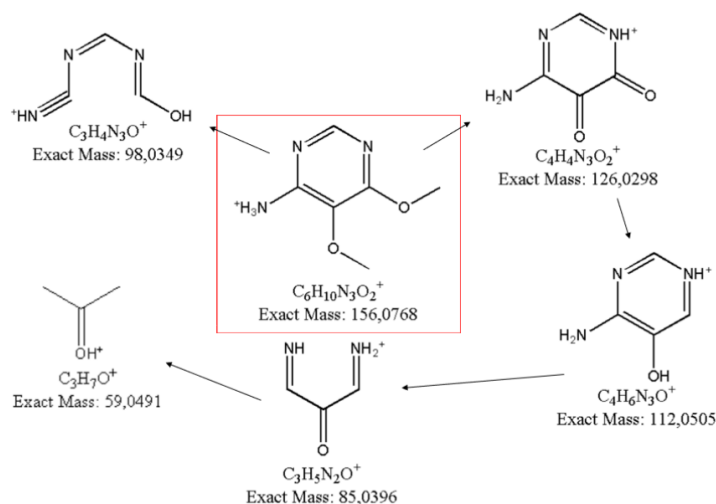
8.2. Ταυτοποίηση Προϊόντων Μετασχηματισμού.

Με τη χρήση HRMS ταυτοποιήθηκαν 17 προϊόντα μετασχηματισμού, τα οποία συνοψίζονται στον **Πίνακα 8.2**. Από αυτά, τα 11 έδωσαν θραύσματα, μέσω του συστήματος Orbitrap, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η αξιοπιστία της ταυτοποίησής τους.

Πίνακας 8.2. Αποτελέσματα HRMS.

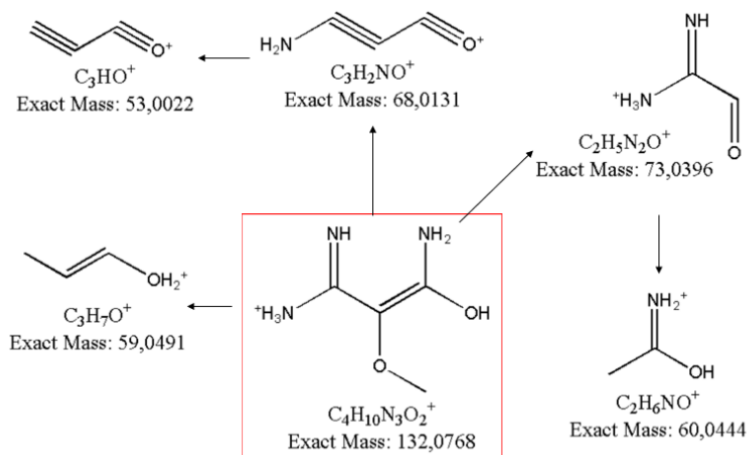
TP_XX	t _R (min)	Molecular Formula (neutral molecule)	Ionization Mode	Adduct Ion	Elemental Composition (m/z)	Theor. Mass	Exp. Mass	RDB	Δ (ppm)
Sulfadoxine	1,16	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	ESI+	[M+H]	[C ₁₂ H ₁₅ N ₄ O ₄ S] ⁺	311,0809	311,0807	7,5	-1,100
TP_156	0,91	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	ESI+	[M+H]	[C ₆ H ₁₀ N ₃ O ₂] ⁺	156,0768	156,0769	3,5	0,685
TP_247a	0,83	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ (v1)	ESI+	[M+H]	[C ₁₂ H ₁₅ N ₄ O ₂] ⁺	247,1190	247,1190	7,5	0,031
TP_247b	0,83	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ (v2)	ESI+	[M+H]	[C ₁₂ H ₁₅ N ₄ O ₂] ⁺	247,1190	247,1189	7,5	-0,292
TP_202	0,72	C ₁₁ H ₂₃ NO ₂	ESI+	[M+H]	[C ₁₁ H ₂₄ NO ₂] ⁺	202,1802	202,1802	0,5	0,269
TP_244	0,72	C ₈ H ₉ N ₃ O ₄ S	ESI+	[M+H]	[C ₈ H ₁₀ N ₃ O ₄ S] ⁺	244,0387	244,0386	5,5	0,193
TP_142	0,74	C ₅ H ₇ N ₃ O ₂	ESI+	[M+H]	[C ₅ H ₈ N ₃ O ₂] ⁺	142,0611	142,0612	3,5	0,401
TP_180	0,69	C ₈ H ₉ N ₃ O ₂	ESI+	[M+H]	[C ₈ H ₁₀ N ₃ O ₂] ⁺	180,0768	180,0769	5,5	0,816
TP_148	0,72	C ₈ H ₉ N ₃	ESI+	[M+H]	[C ₈ H ₁₀ N ₃] ⁺	148,0869	148,0869	5,5	-0,094
TP_302	0,76	C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₅ S	ESI+	[M+H]	[C ₁₁ H ₁₆ N ₃ O ₅ S] ⁺	302,0805	302,0804	5,5	-0,257
TP_237	0,74	C ₁₁ H ₁₆ N ₄ O ₂	ESI+	[M+H]	[C ₁₁ H ₁₇ N ₄ O ₂] ⁺	237,1346	237,1346	5,5	-0,094
TP_242	0,76	C ₈ H ₇ N ₃ O ₄ S	ESI+	[M+H]	[C ₈ H ₈ N ₃ O ₄ S] ⁺	242,0230	242,0230	6,5	0,112
TP_305	0,8	C ₁₀ H ₂₀ N ₆ O ₅	ESI+	[M+H]	[C ₁₀ H ₂₁ N ₆ O ₅] ⁺	305,1568	305,1569	3,5	0,412
TP_132	0,69	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	ESI+	[M+H]	[C ₄ H ₁₀ N ₃ O ₂] ⁺	132,0768	132,0770	1,5	1,869
TP_290	0,74	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₆ S	ESI+	[M+H]	[C ₉ H ₁₂ N ₃ O ₆ S] ⁺	290,0441	290,0438	5,5	-1,146
TP_223	0,69	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ O ₂	ESI+	[M+H]	[C ₁₀ H ₁₅ N ₄ O ₂] ⁺	223,1190	223,1190	5,5	0,214
TP_217	0,74	C ₆ H ₁₂ N ₆ O ₃	ESI+	[M+H]	[C ₆ H ₁₃ N ₆ O ₃] ⁺	217,1044	217,1047	3,5	1,544
TP_173	0,74	C ₄ H ₈ N ₆ O ₂	ESI+	[M+H]	[C ₄ H ₉ N ₆ O ₂] ⁺	173,0781	173,0781	3,5	-0,289

Στην **Εικόνα 8.3** παρουσιάζεται το προϊόν TP156, θεωρητικής μάζας 156,0768 m/z και τα θραύσματα στα οποία βασίστηκε η ταυτοποίησή του. Το συγκεκριμένο μόριο έχει σπουδαία σημασία για την παρούσα μελέτη, καθώς όπως θα αναφερθεί παρακάτω, συμμετέχει σε πολλαπλούς μηχανισμούς από τους οποίους προκύπτουν άλλα προϊόντα μετασχηματισμού. Οι κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους δημιουργήθηκαν τα θραύσματά του ήταν η λύση δεσμών N-C, O-C και C-C.



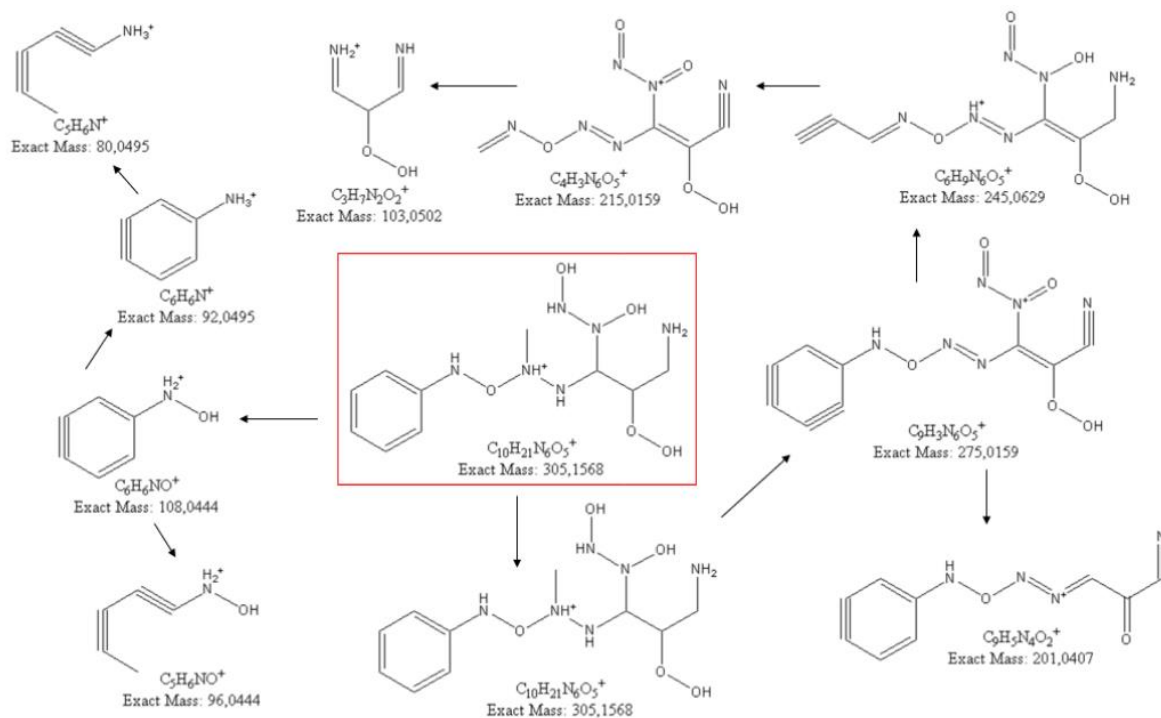
Εικόνα 8.3. Το προϊόν μετασχηματισμού TP156 και τα θραύσματά του.

Στην **Εικόνα 8.4**, παρουσιάζεται το προϊόν μετασχηματισμού TP132, με θεωρητική μάζα 132,0768 m/z. Το συγκεκριμένο μόριο προέρχεται από το TP156. Και σε αυτήν την περίπτωση, οι βασικότεροι μηχανισμοί με τους οποίους δημιουργήθηκαν τα θραύσματά του ήταν η λύση δεσμών N-C, O-C και C-C.



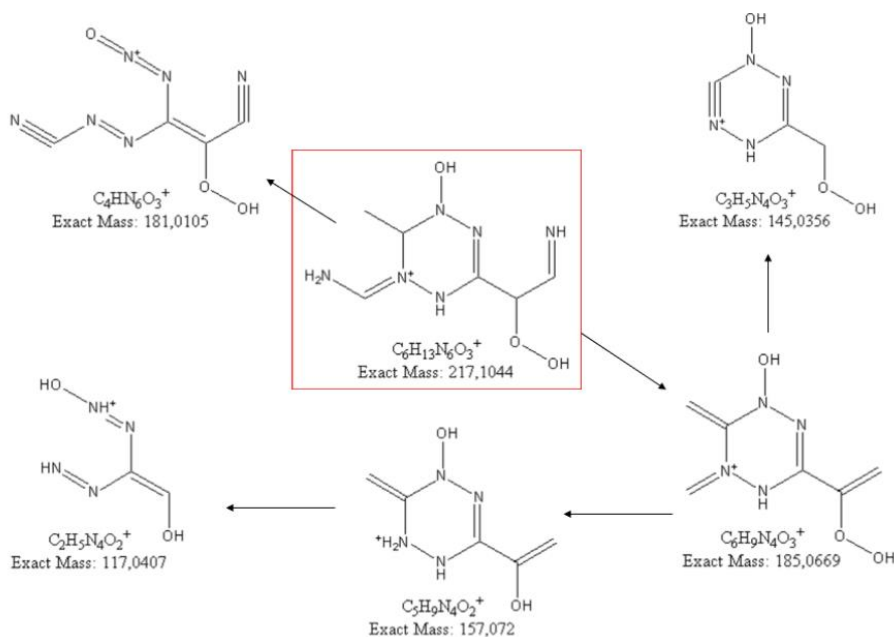
Εικόνα 8.4. Το προϊόν μετασχηματισμού TP132 και τα θραύσματά του.

Στην **Εικόνα 8.5**, παρουσιάζεται το μόριο του TP305, θεωρητικής μάζας 305,1568 m/z και τα θραύσματα βάσει των οποίων ταυτοποιήθηκε. Το συγκεκριμένο πολύπλοκο μόριο, αποτελεί και αυτό θυγατρικό προϊόν μετασχηματισμού του TP156, καθώς ο μηχανισμός του εκκινείται από αυτό.



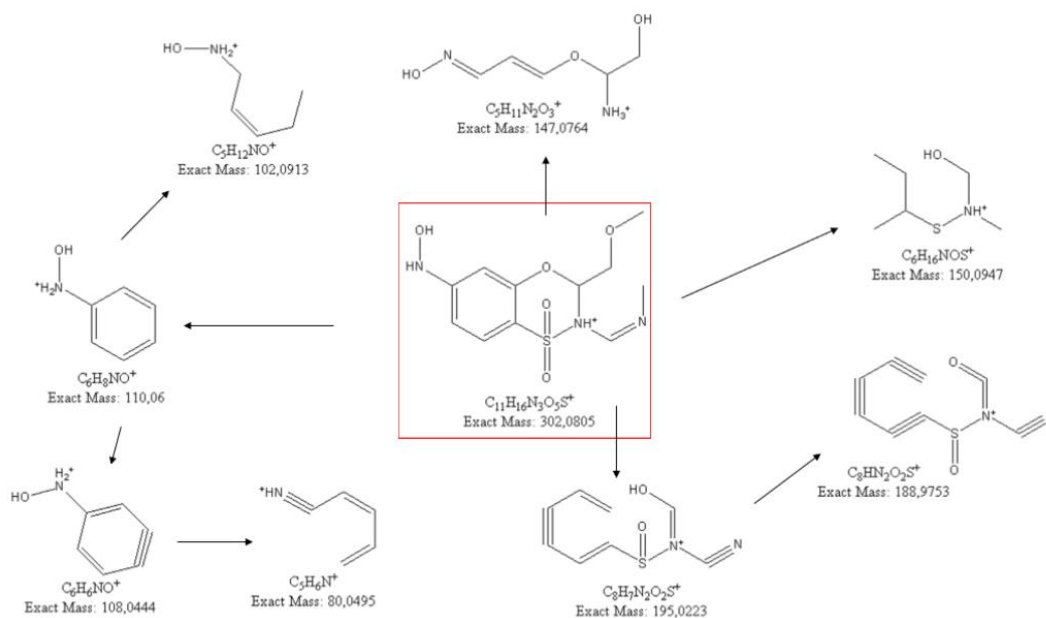
Εικόνα 8.5. Το προϊόν μετασχηματισμού TP305 και τα θραύσματά του.

Ένα άλλο μόριο που συμμετέχει στο μηχανισμό από τον οποίο προκύπτει το TP305 είναι το TP217, με θεωρητική μάζα 217,1044 m/z και παρουσιάζεται στην **Εικόνα 8.6**, μαζί με τα θραύσματά του. Αποτελεί λοιπόν και αυτό θυγατρικό μόριο του TP156.

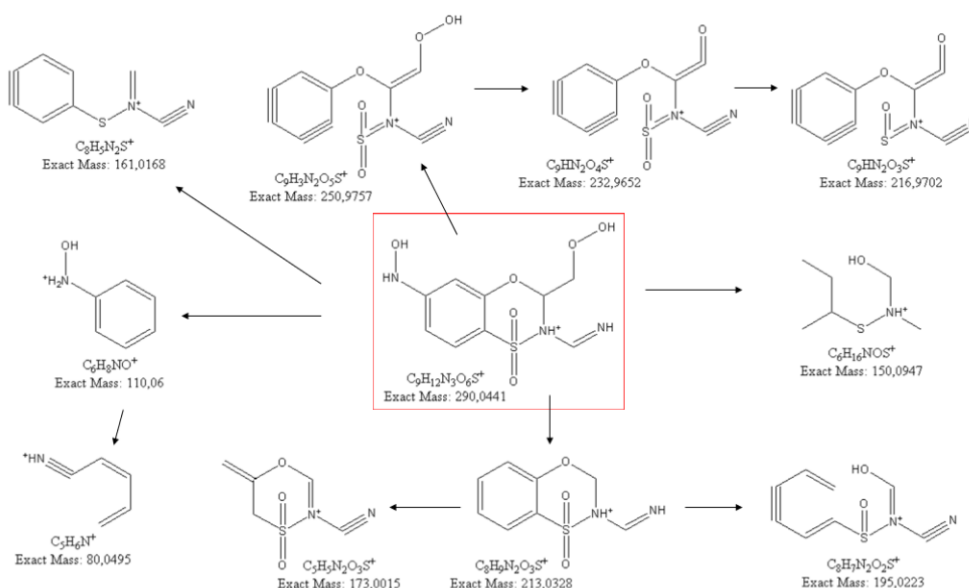


Εικόνα 8.6. Το προϊόν μετασχηματισμού TP217 και τα θραύσματά του.

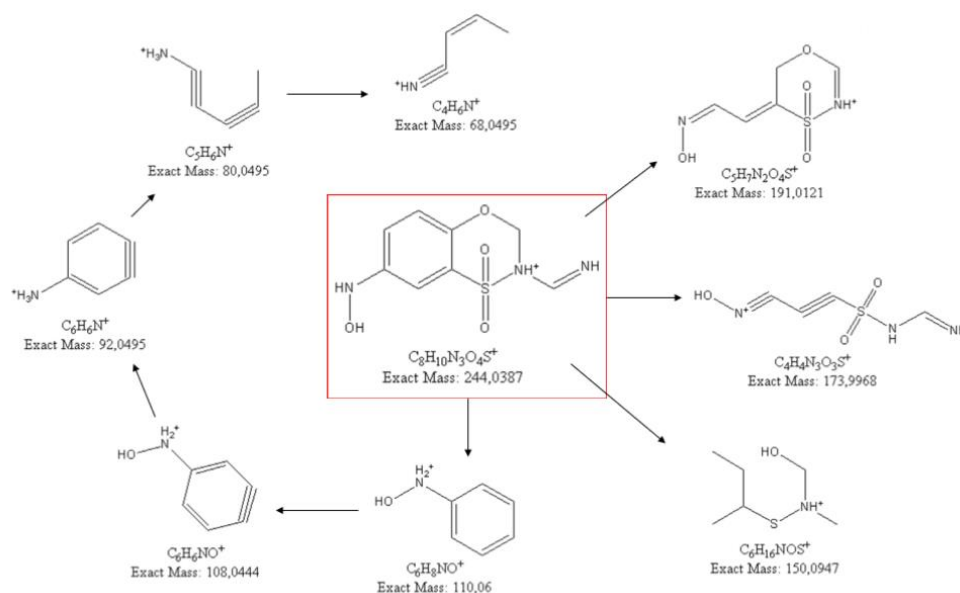
Τα προϊόντα TP302, TP290 και TP244, με θεωρητικές μάζες 302,0805 m/z, 290,0441 m/z και 244,0387 m/z αντίστοιχα, φαίνεται να ανήκουν σε έναν ανεξάρτητο μηχανισμό που δεν σχετίζεται με κάποιο από τα προαναφερθέντα προϊόντα μετασχηματισμού. Μάλιστα, όπως θα αναφερθεί παρακάτω, από τη στιγμή που σχηματιστεί το TP302, απλώς αποικοδομείται καταλήγοντας στα υπόλοιπα μέρη. Τα συγκεκριμένα προϊόντα μετασχηματισμού και τα θραύσματα βάσει των οποίων ταυτοποιήθηκαν παρουσιάζονται στις Εικόνες 8.7-8.9.



Εικόνα 8.7. Το προϊόν μετασχηματισμού TP302 και τα θραύσματά του.

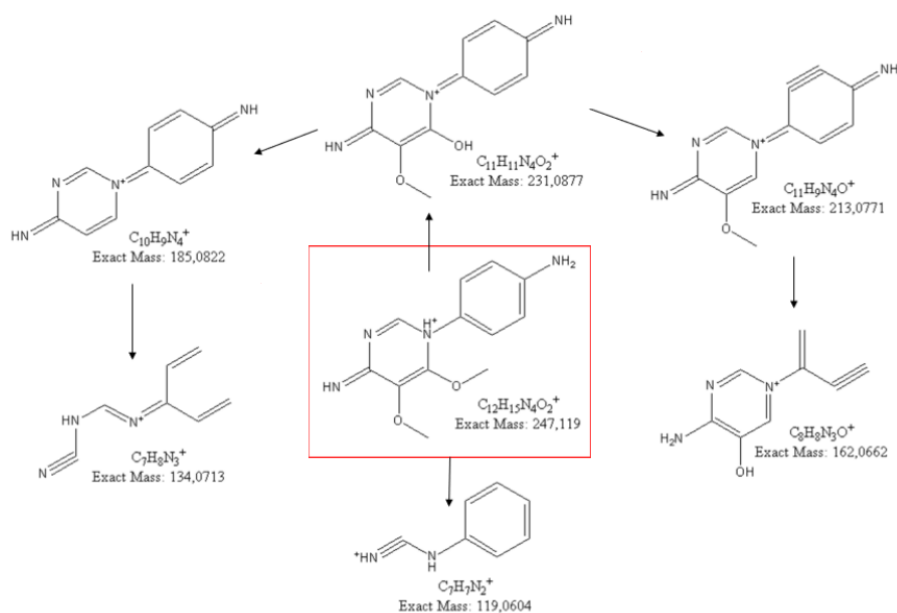


Εικόνα 8.8. Το προϊόν μετασχηματισμού TP290 και τα θραύσματά του.

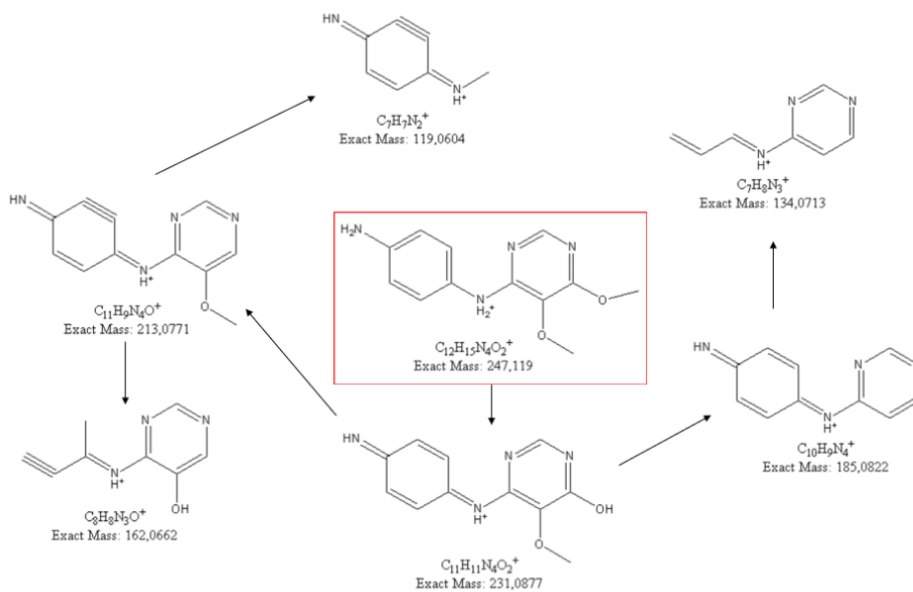


Εικόνα 8.9. Το προϊόν μετασχηματισμού TP244 και τα θραύσματά του.

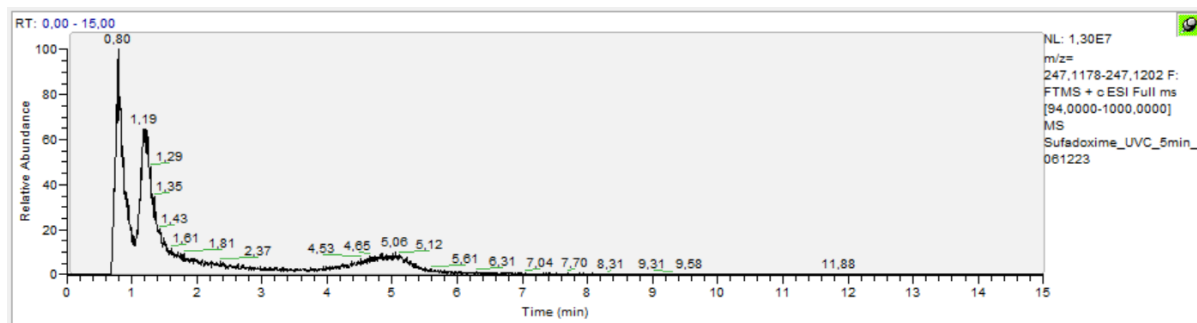
Στις Εικόνες 8.10 και 8.11 παρουσιάζονται δύο ισομερή προϊόντα μετασχηματισμού, το TP247a και το TP247b, με θεωρητική μάζα 247,1190 m/z. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 8.12, στο σχετικό χρωματογράφημα εμφανίζονται 2 διαφορετικές κορυφές ίδιας μάζας. Έτσι, συμπεραίνεται η παρουσία 2 ισομερών μορίων στο δείγμα. Όπως θα αναφερθεί παρακάτω, ο μηχανισμός σχηματισμού τους είναι ίδιος, με μοναδική διαφοροποίηση στο εάν το άτομο N που συμμετέχει στο μηχανισμό ανήκει στη διαζίνη ή όχι. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, οι μηχανισμοί με τους οποίους δημιουργούνται τα θραύσματα των TP247 είναι με λύση N-C, O-C, C-C, ενώ παρουσιάζονται και περιπτώσεις απομάκρυνσης H (λύση δεσμού C-H).



Εικόνα 8.10. Το προϊόν μετασχηματισμού TP247a και τα θραύσματά του.

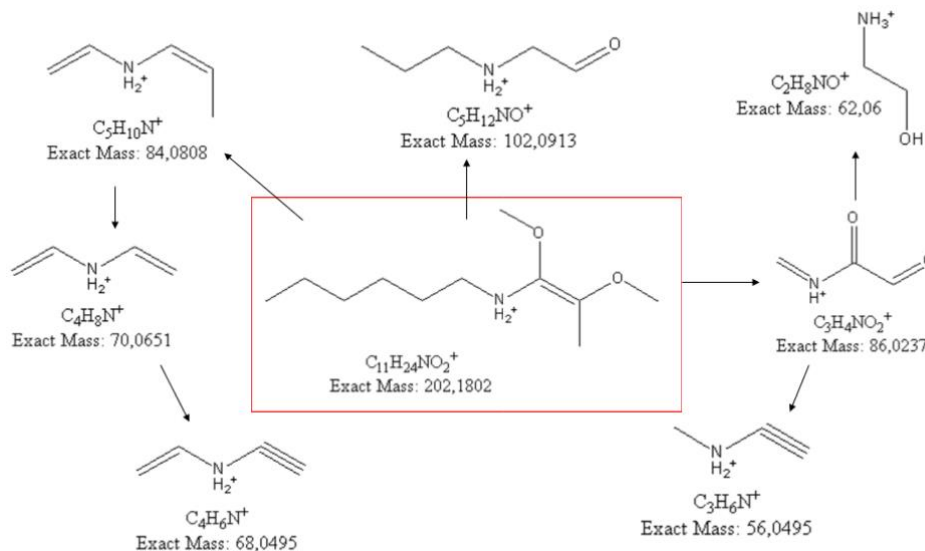


Εικόνα 8.11. Το προϊόν μετασχηματισμού TP247b και τα θραύσματά του.



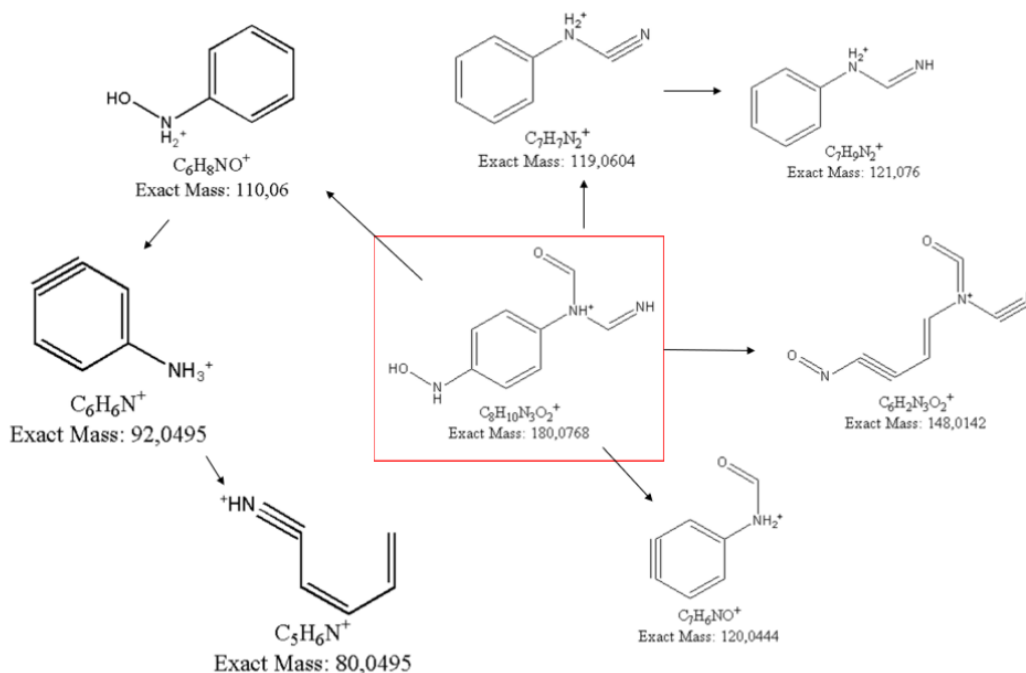
Εικόνα 8.12. Χρωματογράφημα, με τις κορυφές των ισομερών TP247.

Τα μόρια του ζεύγους ισομέρειας TP247 συμμετέχουν σε μηχανισμούς από τους οποίους προκύπτουν περαιτέρω προϊόντα μετασχηματισμού. Μία περίπλοκη περίπτωση είναι το μόριο TP202, θεωρητικής μάζας 202,1802 m/z, που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 8.13**, μαζί με τα θραύσματά του. Το TP202 προκύπτει απευθείας από το TP247a, κατόπιν λύσεις 5 διαφορετικών δεσμών του, ωστόσο αυτό το μέρος θα αναλυθεί παρακάτω.



Εικόνα 8.13. Το προϊόν μετασχηματισμού TP202 και τα θραύσματά του.

Το ζεύγος ισομερών TP247 ο μόριο TP247a συμμετέχει σε έναν μηχανισμό από τον οποίο προκύπτει προϊόν μετασχηματισμού με θεωρητική μάζα 180,0768 m/z (TP180). Το TP180 και τα θραύσματα από τα οποία προκύπτει η ταυτοποίησή του παρουσιάζονται στην **Εικόνα 8.14**.



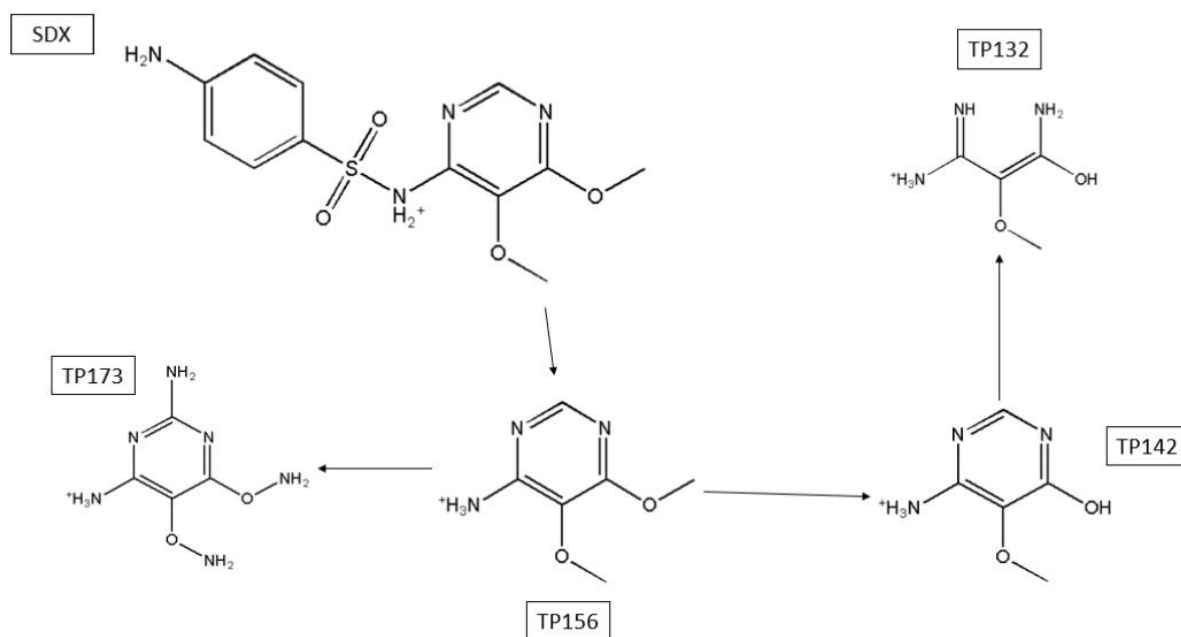
Εικόνα 8.14. Το προϊόν μετασχηματισμού TP180 και τα θραύσματά του.

Τα προϊόντα TP142, TP148, TP173, TP223, TP237 και TP242 βρίσκονταν σε πολύ μικρή συγκέντρωση, με αποτέλεσμα η ταυτοποίησή τους να βασιστεί σε πιθανούς μηχανισμούς που οδηγούν στο σχηματισμό τους και τις ενδείξεις το λογισμικού του οργάνου.

8.3. Μηχανισμοί σχηματισμού προϊόντων μετασχηματισμού.

Όπως αναφέρθηκε στην παραπάνω ενότητα, 6 εκ των 17 προϊόντων μετασχηματισμού βρίσκονταν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να ληφθούν φάσματα μάζας των θραυσμάτων τους. Έτσι, για την προσεγγιστική ταυτοποίησή τους είναι απαραίτητη η κατανόηση των μηχανισμών σχηματισμού τους.

Αρχικά, ένας κομβικής σημασίας μηχανισμός είναι αυτός από τον οποίο προκύπτει το TP156, το οποίο όπως προαναφέρθηκε αποτελεί την αφετηρία σχηματισμού και άλλων προϊόντων. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 8.15**, το TP156 προκύπτει κατόπιν λύσης του δεσμού S-N της Σουλφαδοξίνης. Εν συνεχεία, με απομάκρυνση ενός άνθρακα από έναν αιθερικό βραχίονα, σχηματίζεται το TP142, από το οποίο προκύπτει TP132, κατόπιν αφαίρεσης ενός άνθρακα της διαζίνης. Επίσης, η δομή του TP173 θα μπορούσε να εξηγηθεί, από έναν μηχανισμό λύσης 2 δεσμών C-O και προσθήκης 4 αμινικών άκρων.

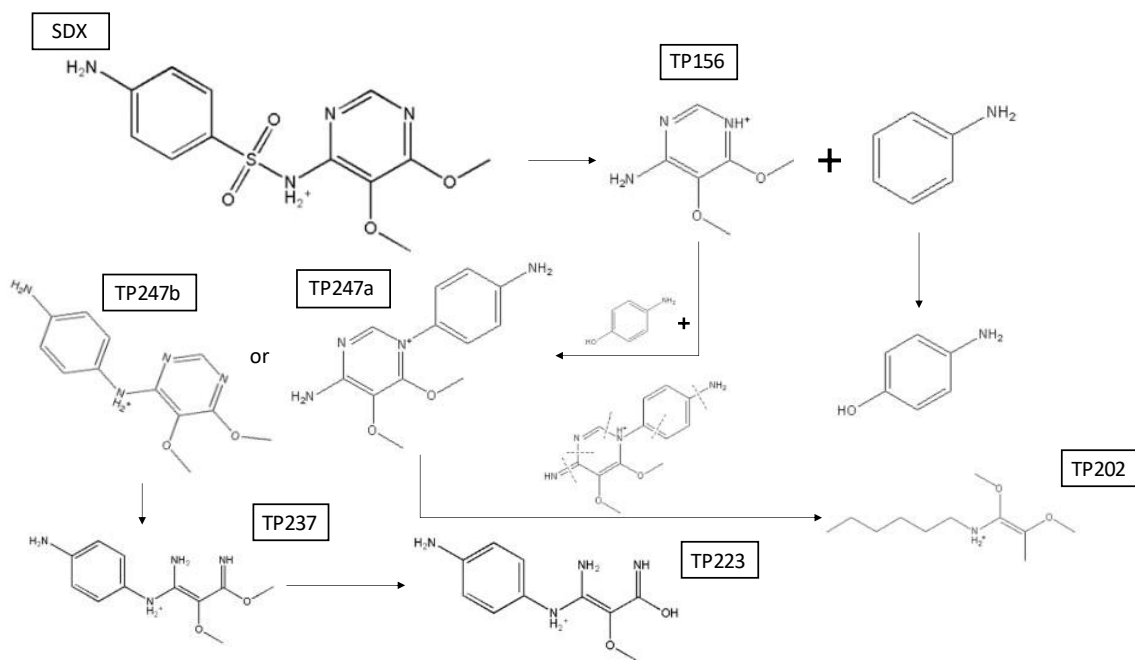


Εικόνα 8.15. Μηχανισμός σχηματισμού των προϊόντων TP156, TP173, TP142 και TP132.

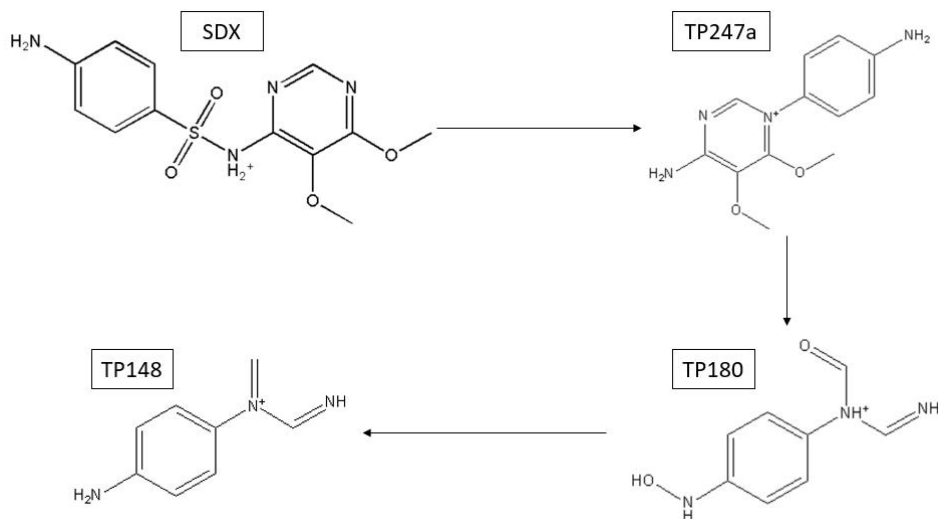
Βάσει των ταυτοποιημένων ενώσεων TP247a και TP247b θα έπρεπε να σχηματίζεται κάποιο μόριο αμινοφαινόλης, που αντιδρώντας με το TP156 (είτε με το αμινικό άκρο είτε με ένα N της διαζίνης), οδηγεί στη σύνθεσή τους. Η TP247b αποτελεί θυγατρικό μόριο των TP237 και TP223, που είναι προϊόντα της απομάκρυνσης ενός C από τη διαζίνη και εν συνεχεία της λύσης ενός δεσμού C-O αντίστοιχα. Το TP202 είναι προϊόν μετασχηματισμού που προέρχεται από τη διάσπαση του TP247a. Για να συμβεί αυτό, πρέπει να σπάσουν τα 2 αμινικά άκρα, ένας δεσμός N-C της διαζίνης και ένας δεσμός C-C του βενζολίου. Τα παραπάνω συνοψίζονται στην **Εικόνα 8.16**.

Στην **Εικόνα 8.17** περιγράφεται ο μηχανισμός από τον οποίο προκύπτουν τα μόρια TP180 και TP148, ξεκινώντας από το TP247a. Το TP180 σχηματίζεται με «σπάσιμο» της διαζίνης σε 2 σημεία (με λύση

δεσμών N-C και C-C), λύση δεσμού C-O και υδροξυλίωση του αμινικού άκρου, όπως φαίνεται στο αντίστοιχο σχέδιο. Στη συνέχεια, με απομάκρυνση των O, σχηματίζεται το TP148.



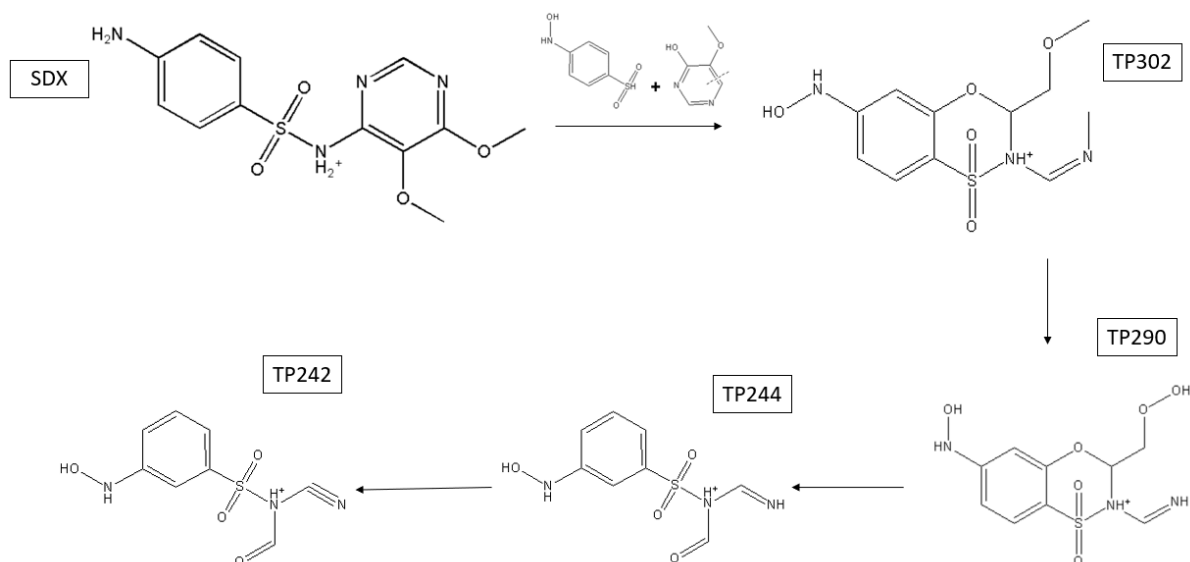
Εικόνα 8.16. Μηχανισμός σχηματισμού των προϊόντων TP247a, TP247b, TP237, TP223 και TP202.



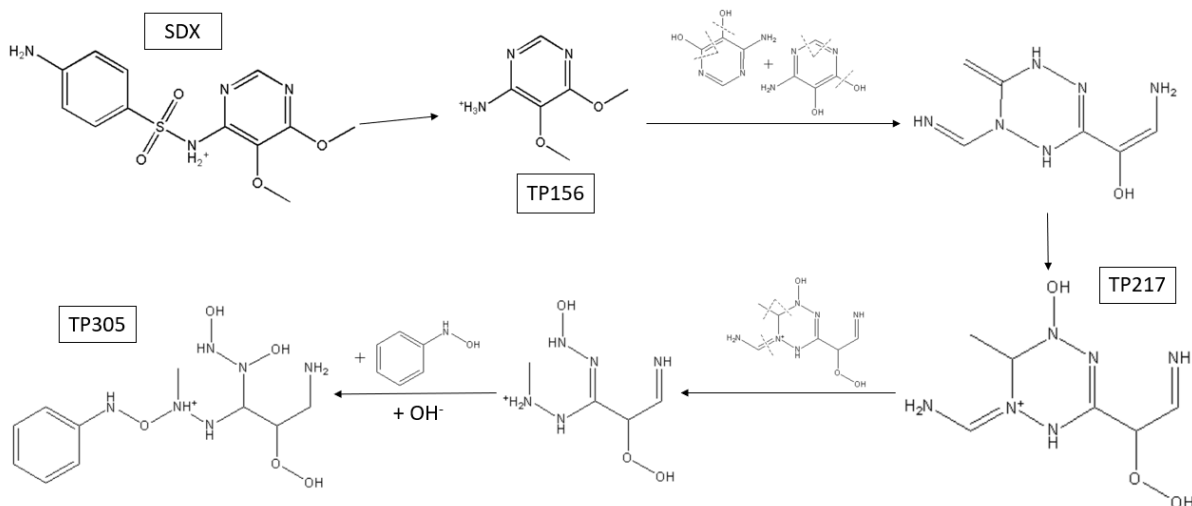
Εικόνα 8.17. Μηχανισμός σχηματισμού των προϊόντων TP247a, TP180 και TP148.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 8.18, το ταυτοποιημένο με θραύσματα προϊόν μετασχηματισμού TP302 θα μπορούσε να εξηγηθεί από την αντίδραση 2 άλλων προϊόντων που δεν έχουν όμως ανιχνευθεί. Ωστόσο, πρόκειται για μόρια που θα αναμενόταν να σχηματιστούν κάποια στιγμή στο διάλυμα. Έτσι, θα μπορούσε να υφίσταται ο συγκεκριμένος μηχανισμός. Συγκεκριμένα πρόκειται για το υδροξυλιωμένο μέρος της Σουλφαδοξίνης που μένει, αν αφαιρεθεί το μόριο TP156 και ένα προϊόν

αποικοδόμησης του TP156. Το TP290 προκύπτει από την απομάκρυνση 2 άκρων C (με λύση δεσμών N-C και C-O) και υδροξυλίωση του οξυγόνου με το οποίο συνδεόταν ο ένας C. Το TP244 προκύπτει από αφαίρεση του OH και λύση του δεσμού C-O στον οποίο συμμετέχει βενζοϊκός άνθρακας. Τέλος, το TP242, αν και δεν έχει ταυτοποιηθεί με ανίχνευση θραυσμάτων, θα μπορούσε να προκύψει από την απόσπαση 2 H από το TP244.



Εικόνα 8.18. Μηχανισμός σχηματισμού των προϊόντων TP302, TP290, TP244 και TP242.



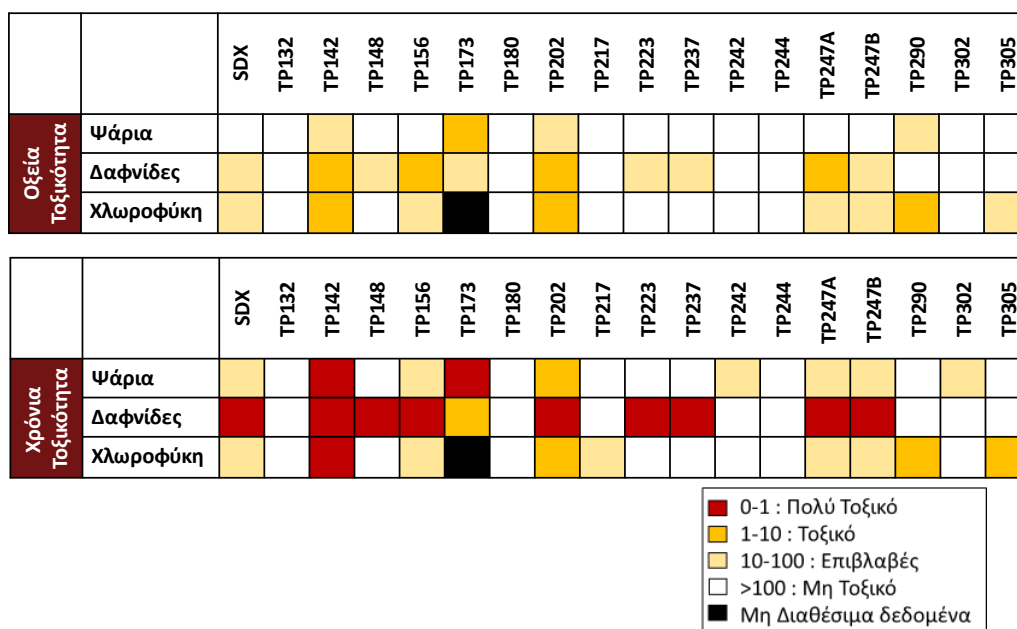
Εικόνα 8.19. Μηχανισμός σχηματισμού των προϊόντων TP217 και TP305.

Ο συνδυασμός 2 μορίων TP156, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 8.19, οδηγεί σε ένα ενδιάμεσο προϊόν που αν υδροξυλιωθεί διαμορφώνεται στο TP217. Τέλος, με λύση 2 δεσμών N-C και ενός C-C, σχηματίζεται ένα άλλο ενδιάμεσο προϊόν, που με προσθήκη ενός OH και μίας φαινυλουδροξυλαμίνης, καταλήγει στην τελική μορφή του μορίου TP305.

8.4. Εκτίμηση τοξικότητας προϊόντων μετασχηματισμού.

Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος, ένα χρήσιμο εργαλείο για την πρόβλεψη της τοξικότητας είναι το πρόγραμμα ECOSAR. Το ECOSAR αξιοποιεί το σύστημα QSAR για να εξαγάγει στατιστικές εκτιμήσεις σχετικά με τη βιολογική δραστηριότητα και την οξεία και τη χρόνια τοξικότητα μιας ευρείας σειράς οργανικών χημικά σε ψάρια, υδρόβια ασπόνδυλα και υδρόβια φυτά.

Τα είδη για τα οποία εξετάστηκε η τοξικότητα των προϊόντων μετασχηματισμού είναι τα ψάρια, οι δαφνίδες και τα χλωροφύκη. Η εκτίμηση οξείας τοξικότητας έγινε με βάση τις τιμές LC50/EC50 που εξήγαγε το πρόγραμμα, ενώ η χρόνια τοξικότητα εκτιμήθηκε βάση των τιμών ChV. Η κατηγοριοποίηση έγινε ακολουθώντας την ίδια αρχή που εφαρμόστηκε σε προηγούμενως δημοσιευμένη εργασία [320], καθώς και σε σχετική ευρωπαϊκή οδηγία (1272/2008/EC) [338]. Συνολικά τα αποτελέσματα αναπαρίστανται γραφικά στην **Εικόνα 8.20**.



Εικόνα 8.20. Γραφική αναπαράσταση της ταξινόμησης των προϊόντων μετασχηματισμού σε κατηγορίες τοξικότητας.

Η ένωση της Σουλφαδοξίνης εμφανίζει προβληματισμό κυρίως λόγω της δράσης της ως ανιλίνη, εμφανίζοντας ήπια τοξικότητα βραχυπρόθεσμα, αλλά πολύ έντονη χρόνια τοξικότητα για την περίπτωση των Δαφνίδων. Εκτός της Σουλφαδοξίνης, τα προϊόντα TP148, TP156, TP223, TP237, TP247A και TP247B προβληματίζουν λόγω της ανιλινικής φύσης τους. Το TP148, χάνοντας 2 -OH (1 συνδεδεμένο με N), φαίνεται να καθίσταται μη τοξικό για ψάρια και χλωροφύκη, διατηρώντας όμως τα ίδια επίπεδα τοξικότητας με το μητρικό μόριο, αναφορικά με τις δαφνίδες. Οι ενώσεις TP156 και TP247A, φαίνεται να παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά με τη Σουλφαδοξίνη, με ελαφρώς εντονότερη οξεία τοξικότητα απέναντι στις δαφνίδες, ενώ το TP247B παρουσιάζει ακριβώς την ίδια τοξικότητα με το μητρικό μόριο. Τα TP223 και TP237 εμφανίζουν την ίδια τοξικότητα με το TP148.

Η παρουσία αμίνης σε υδροξυλιωμένο δακτύλιο διαζίνης αποτελεί την αιτία τοξικότητας του TP142. Η ένωση αυτή είναι τοξικότερη του μητρικού μορίου τους, εμφανίζοντας έντονη μακροπρόθεσμη τοξικότητα κατά και των 3 οργανισμών. Ως προς τις βραχυπρόθεσμες επιπτώσεις, η ένωση είναι τοξική απέναντι σε δαφνίδες και χλωροφύκη, ενώ παρατηρείται πως είναι επιβλαβής για τα ψάρια.

Τα αμίδια είναι επίσης γνωστά για την οικοτοξικότητά τους. Στο συγκεκριμένο σύνολο προϊόντων μετασχηματισμού, εντοπίζονται 3 περιπτώσεις ενώσεων που συμπεριφέρονται παρόμοια με αυτήν την κατηγορία και αυτές είναι η TP242, TP244 και TP302. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός πως οι ενώσεις αυτές ανήκουν στον ίδιο μηχανισμό σχηματισμού, ενώ γενικότερα δεν εμφανίζουν ιδιαίτερη τοξικότητα, με εξαίρεση τις TP242 και TP302, που έχουν ήπια μακροπρόθεσμη επίδραση στα ψάρια.

Το TP290 ανήκει και αυτό στον μηχανισμό των TP242, TP244 και TP302, ωστόσο κατά την έκθεσή του στο περιβάλλον φαίνεται να υπερισχύει η συμπεριφορά του ως υπεροξυ-οξύ. Η ένωση αυτή πέρα από μίας ήπιας βραχυπρόθεσμης επίδρασης στα ψάρια εμφανίζει τοξικότητα (οξεία και χρόνια) απέναντι στα χλωροφύκη.

Οι ενώσεις TP217 και TP305, κατόπιν απελευθέρωσής τους στο υδάτινο περιβάλλον, συμπεριφέρονται σαν υδραζίνες. Η TP217 εμφανίζει πιο ήπια τοξικότητα από την TP305, γεγονός που υποδηλώνει πως οι αλλαγές που συμβαίνουν στη δομή της πρώτης, οδηγούν σε ένα πιο επικίνδυνο μόριο. Συγκεκριμένα, η TP217 είναι απλώς επιβλαβής για τα χλωροφύκη σε μακροπρόθεσμη έκθεση, ενώ η TP305 εμφανίζει επιπτώσεις σε μικρότερο χρόνο και καθίσταται τοξική σε χρόνια βάση.

Οι βινυλικές αλκοόλες γενικά εμφανίζουν ευρύ φάσμα τοξικότητας. Από τη Σουλφαδοξίνη φάνηκε να προκύπτει μόριο με ανάλογη συμπεριφορά, το TP132. Η συγκεκριμένη ένωση δεν παρουσίασε καμία τοξικότητα τόσο σε βραχυπρόθεσμη, όσο και σε μακροπρόθεσμη έκθεση.

Αντίστοιχα, μη τοξικό (ως προς οξεία και χρόνια επίδραση) φάνηκε να είναι και το TP180, που σύμφωνα με την ανάλυση QSAR κατατάσσεται στην κατηγορία των ουδέτερων οργανικών ενώσεων.

Τέλος, η ιδιαίτερη ένωση του TP202, ανήκει στις αλειφατικές αμίνες και φάνηκε να αυξάνει σε τοξικότητα, συγκριτικά με την Σουλφαδοξίνη. Συγκεκριμένα, η ένωση είναι επιβλαβής για τα ψάρια και τοξική για δαφνίδες και χλωροφύκη σε βραχυπρόθεσμη έκθεση. Η χρόνια τοξικότητα της φάνηκε να αυξάνεται κατά μία κλίμακα επικινδυνότητας (από επιβλαβής σε τοξική) για ψάρια και χλωροφύκη, ενώ παρέμεινε πολύ τοξική για τις δαφνίδες.

9. Συμπεράσματα.

Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος, η σουλφαδοξίνη, είναι ένα σουλφοναμίδιο που χρησιμοποιείται για την θεραπεία της ελονοσίας. Ωστόσο, γενικότερα η αυξημένη χρήση φαρμακευτικών προϊόντων οδηγεί σε περιβαλλοντική ρύπανση, που μπορεί να προκαλέσει αρνητικές καταστάσεις, όπως η ανάπτυξη βακτηριακής ανοσίας στα αντιβιοτικά.

Όπως έχει αποδειχθεί, ένας φαρμακευτικός ρύπος κατά την είσοδο του στο περιβάλλον υφίσταται αλλαγές στη δομή του μέσω διαφορετικών φυσικοχημικών διεργασιών, με αποτέλεσμα το σχηματισμό διαφόρων προϊόντων μετασχηματισμού. Οι ενώσεις αυτές είναι συνήθως άγνωστες και δεν υπάρχουν αναλυτικά πρότυπα εμπορικά διαθέσιμα προκειμένου να ταυτοποιηθεί η δομή τους. Για το λόγο αυτό καθίσταται επιτακτική ανάγκη τόσο η διερεύνηση των μηχανισμών διάσπασης της μητρικής ένωσης όσο και η ανάπτυξη μεθόδων για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό αυτών των ενώσεων έτσι ώστε να εκτιμηθεί η επικινδυνότητά τους στο περιβάλλον.

Οι Προηγμένες Οξειδωτικές Μέθοδοι Αντιρρύπανσης που χρησιμοποιούνται για την περεταίρω επεξεργασία λυμάτων και την απομάκρυνση αναδυόμενων ρύπων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να παραχθούν σε εργαστηριακή κλίμακα διάφορα προϊόντα μετασχηματισμού των μητρικών ενώσεων μέσω διαφόρων οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την αποικοδόμηση της μητρικής ένωσης.

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μια αναλυτικής μεθόδου, υγρής χρωματογραφίας, για τον προσδιορισμό του φαρμακευτικού ρύπου Σουλφαδοξίνη και των προϊόντων μετασχηματισμού του, αξιοποιώντας ένα σύστημα HPLC-DAD για την ποσοτικοποίηση της Σουλφαδοξίνης και ενός συστήματος UHPLC-MS/MS Orbitrap-HRMS, για την ταυτοποίηση των προϊόντων μετασχηματισμού.

Επειδή δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα αναλυτικά πρότυπα για προϊόντα μετασχηματισμού, μέρος της εργασίας αποτέλεσε η εφαρμογή μίας ποικιλίας διαφορετικών ΠΟΜΑ, προκειμένου να παραχθούν οι άγνωστοι αναλύτες.

Από τις αναλύσεις των δειγμάτων, ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς 17 προϊόντα μετασχηματισμού, που αναφέρονται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, καθώς επίσης έγινε μία προσέγγιση για να καταστεί κατανοητός ο μηχανισμός σχηματισμού τους. Με χρήση του λογισμικού ECOSAR εκτιμήθηκε η τοξικότητά τους, με ποικιλία ευρημάτων, καθώς αναφέρονται τόσο ενώσεις που δεν εμφανίζουν τοξικότητα, όσο ενώσεις σημαντικά τοξικότερες από το μητρικό ρύπο.

Από την εργασία αυτή προκύπτει μία σαφής, απλή και αξιόπιστη αναλυτική στρατηγική, για τον προσδιορισμό προϊόντων μετασχηματισμού, συγκεκριμένων φαρμακευτικών ρύπων. Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν, δίνουν χρήσιμες πληροφορίες για την πρόβλεψη σχηματισμού τοξικών ενώσεων, κατά την πορεία τους, πριν αφεθούν ελεύθερες στο περιβάλλον.

Τέλος, η ανάπτυξη τέτοιων αναλυτικών μεθόδων αποτελεί μία σύγχρονη αναγκαιότητα, για την έγκυρη ανίχνευση, ταυτοποίηση και παρακολούθηση αναδυόμενων ρύπων.

10.Βιβλιογραφία

1. Fuchs SM, Elsner P (2003) Sulfonamides in dermatology. Clin Dermatol 21:7–11. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(02\)00326-7](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(02)00326-7)
2. Gerhard Domagk. In: Sci. Hist. Inst. <https://sciencehistory.org/education/scientific-biographies/gerhard-domagk/>. Accessed 20 Oct 2023
3. Masaret GS (2020) Synthesis, Docking and Antihypertensive Activity of Pyridone Derivatives. ChemistrySelect 5:13995–14003. <https://doi.org/10.1002/slct.202003959>
4. Kořak U, Brus B, Knez D, et al (2018) The Magic of Crystal Structure-Based Inhibitor Optimization: Development of a Butyrylcholinesterase Inhibitor with Picomolar Affinity and in Vivo Activity. J Med Chem 61:119–139. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01086>
5. Shetnev A, Shlenev R, Efimova J, et al (2019) 1,3,4-Oxadiazol-2-ylbenzenesulfonamides as privileged structures for the inhibition of monoamine oxidase B. Bioorg Med Chem Lett 29:126677. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126677>
6. Van Berkel MA, Elefritz JL (2018) Evaluating off-label uses of acetazolamide. Am J Health Syst Pharm 75:524–531. <https://doi.org/10.2146/ajhp170279>
7. Becerra D, Portilla J, Rojas H, et al (2024) Regioselective N-sulfonylation of 3-(methylthio)-1H-1,2,4-triazol-5-amine: Spectroscopic, thermal, crystal structure, and anticancer studies. J Mol Struct 1295:.. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.136616>
8. Said MA, Eldehna WM, Nocentini A, et al (2020) Sulfonamide-based ring-fused analogues for CAN508 as novel carbonic anhydrase inhibitors endowed with antitumor activity: Design, synthesis, and in vitro biological evaluation. Eur J Med Chem 189:112019. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.112019>
9. Krasavin M, Korsakov M, Dorogov M, et al (2015) Probing the ‘bipolar’ nature of the carbonic anhydrase active site: Aromatic sulfonamides containing 1,3-oxazol-5-yl moiety as picomolar inhibitors of cytosolic CA I and CA II isoforms. Eur J Med Chem 101:334–347. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.022>
10. Moskalik MY (2022) Sulfonamides with Heterocyclic Periphery as Antiviral Agents. Mol Basel Switz 28:51. <https://doi.org/10.3390/molecules28010051>
11. Kalinin S, Kovalenko A, Valtari A, et al (2022) 5-(Sulfamoyl)thien-2-yl 1,3-oxazole inhibitors of carbonic anhydrase II with hydrophilic periphery. J Enzyme Inhib Med Chem 37:1005–1011. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2056733>
12. Shin YS, Lee JY, Noh S, et al (2021) Discovery of cyclic sulfonamide derivatives as potent inhibitors of SARS-CoV-2. Bioorg Med Chem Lett 31:127667. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127667>
13. Lamothe SM, Guo J, Li W, et al (2016) The Human Ether-a-go-go-related Gene (hERG) Potassium Channel Represents an Unusual Target for Protease-mediated Damage. J Biol Chem 291:20387–20401. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.743138>
14. Wojaczyńska E, Turowska-Tyrk I, Skarżewski J (2012) Novel chiral bridged azepanes: stereoselective ring expansion of 2-azanorbornan-3-yl methanols. Tetrahedron 68:7848–7854. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.07.028>

15. Samadaei M, Pinter M, Senfter D, et al (2020) Synthesis and Cytotoxic Activity of Chiral Sulfonamides Based on the 2-Azabicycloalkane Skeleton. *Molecules* 25:2355. <https://doi.org/10.3390/molecules25102355>
16. Iwan D, Kamińska K, Denel-Bobrowska M, et al (2022) Chiral sulfonamides with various N-heterocyclic and aromatic units – Synthesis and antiviral activity evaluation. *Biomed Pharmacother* 153:113473. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113473>
17. Carocci M, Bakkali-Kassimi L (2012) The encephalomyocarditis virus. *Virulence* 3:351–367. <https://doi.org/10.4161/viru.20573>
18. W F, A M (2019) Ebola Virus: Pathogenesis and Countermeasure Development. *Annu Rev Virol* 6:. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015708>
19. Sokolova AS, Baranova DV, Yarovaya OI, et al (2019) Synthesis of (1S)-(+)-camphor-10-sulfonic acid derivatives and investigations in vitro and in silico of their antiviral activity as the inhibitors of fi lovirus infections. *Russ Chem Bull* 68:1041–1046. <https://doi.org/10.1007/s11172-019-2517-0>
20. Abdel-Aziz AA-M, Angeli A, El-Azab AS, et al (2019) Synthesis and anti-inflammatory activity of sulfonamides and carboxylates incorporating trimellitimides: Dual cyclooxygenase/carbonic anhydrase inhibitory actions. *Bioorganic Chem* 84:260–268. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.11.033>
21. Kmoníčková E, Potměšil P, Holý A, Zidek Z (2006) Purine P1 receptor-dependent immunostimulatory effects of antiviral acyclic analogues of adenine and 2,6-diaminopurine. *Eur J Pharmacol* 530:179–187. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.11.037>
22. McLaren C, Datema R, Knupp CA, Buroker RA (1991) Didanosine. *Antivir Chem Chemother* 2:321–328. <https://doi.org/10.1177/095632029100200601>
23. Valiaeva N, Beadle JR, Aldern KA, et al (2006) Synthesis and antiviral evaluation of alkoxyalkyl esters of acyclic purine and pyrimidine nucleoside phosphonates against HIV-1 in vitro. *Antiviral Res* 72:10–19. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.03.007>
24. Lee K, Choi Y, Gullen E, et al (1999) Synthesis and Anti-HIV and Anti-HBV Activities of 2'-Fluoro-2',3'-unsaturated l-Nucleosides. *J Med Chem* 42:1320–1328. <https://doi.org/10.1021/jm980651u>
25. Ashry ESHE, Rashed N, Abdel-Rahman A, et al (2006) Synthesis of 2-bromomethyl-3-hydroxy-2-hydroxymethyl-propyl pyrimidine and theophylline nucleosides under microwave irradiation. Evaluation of their activity against hepatitis B virus. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 25:925–939. <https://doi.org/10.1080/15257770600793919>
26. Bhat MA, Tüzün B, Alsaif NA, et al (2022) Synthesis, characterization, molecular modeling against EGFR target and ADME/T analysis of novel purine derivatives of sulfonamides. *J Mol Struct* 1257:132600. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132600>
27. Garcia LS (2010) Malaria. *Clin Lab Med* 30:93–129. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.001>
28. Wells MB, Andrew DJ (2015) “Salivary gland cellular architecture in the Asian malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*.” *Parasit Vectors* 8:617. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1229-z>

29. Aly ASI, Vaughan AM, Kappe SHI (2009) Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu Rev Microbiol* 63:195–221. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073403>
30. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW, Craig CF (1984) *Clinical parasitology*, 9th ed. Lea & Febiger, Philadelphia
31. Beier JC (1998) Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu Rev Entomol* 43:519–543. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.519>
32. Milner DA (2018) Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8:a025569. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>
33. Barber BE, Grigg MJ, Cooper DJ, et al (2021) Clinical management of Plasmodium knowlesi malaria. *Adv Parasitol* 113:45–76. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2021.08.004>
34. Maier AG, Matuschewski K, Zhang M, Rug M (2019) Plasmodium falciparum. *Trends Parasitol* 35:481–482. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.010>
35. Groger M, Fischer HS, Veletzky L, et al (2017) A systematic review of the clinical presentation, treatment and relapse characteristics of human Plasmodium ovale malaria. *Malar J* 16:112. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1759-2>
36. Veletzky L, Groger M, Lagler H, et al (2018) Molecular evidence for relapse of an imported Plasmodium ovale wallikeri infection. *Malar J* 17:78. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2226-4>
37. Lou J, Lucas R, Grau GE (2001) Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev* 14:810–820, table of contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.810-820.2001>
38. Peterson AT (2009) Shifting suitability for malaria vectors across Africa with warming climates. *BMC Infect Dis* 9:59. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-59>
39. Ikemoto T (2008) Tropical malaria does not mean hot environments. *J Med Entomol* 45:963–969. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[963:tmdnmh\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[963:tmdnmh]2.0.co;2)
40. Ap D, N V, Ar A, A K (2008) Malaria in India: challenges and opportunities. *J Biosci* 33:. <https://doi.org/10.1007/s12038-008-0076-x>
41. Chin T, Welsby P (2004) Malaria in the UK: past, present, and future. *Postgrad Med J* 80:663–666. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2004.021857>
42. Kapoor VK (1988) Sulfadoxine. In: Florey K (ed) *Analytical Profiles of Drug Substances*. Academic Press, pp 571–605
43. National Center for Biotechnology Information (2023) Sulfadoxine. CID:17134, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfadoxine>
44. Calderón F, Wilson DM, Gamo F-J (2013) Chapter Three - Antimalarial Drug Discovery: Recent Progress and Future Directions. In: Lawton G, Witty DR (eds) *Progress in Medicinal Chemistry*. Elsevier, pp 97–151

45. Hammoudeh DI, Zhao Y, White SW, Lee RE (2013) Replacing sulfa drugs with novel DHPS inhibitors. *Future Med Chem* 5:1331–1340. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.97>
46. Babaoglu K, Qi J, Lee RE, White SW (2004) Crystal Structure of 7,8-Dihydropteroate Synthase from *Bacillus anthracis*: Mechanism and Novel Inhibitor Design. *Structure* 12:1705–1717. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.07.011>
47. Chen GX, Zolg JW (1987) Purification of the bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase complex from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Pharmacol* 32:723–730
48. Zhang K, Rathod PK (2002) Divergent regulation of dihydrofolate reductase between malaria parasite and human host. *Science* 296:545–547. <https://doi.org/10.1126/science.1068274>
49. Yun M-K, Wu Y, Li Z, et al (2012) Catalysis and Sulfa Drug Resistance in Dihydropteroate Synthase. *Science* 335:1110–1114. <https://doi.org/10.1126/science.1214641>
50. Ranjan N, Singh PK, Maurya NS (2022) Pharmaceuticals in water as emerging pollutants for river health: A critical review under Indian conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 247:114220. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114220>
51. Rastogi A, Tiwari MK, Ghangrekar MM (2021) A review on environmental occurrence, toxicity and microbial degradation of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). *J Environ Manage* 300:113694. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113694>
52. Van D-A, Ngo TH, Huynh TH, et al (2021) Distribution of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in aquatic environment in Hanoi and Metro Manila. *Environ Monit Assess* 193:847. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09622-w>
53. Al-Kaf A (2017) Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. BoD – Books on Demand
54. Cashman JN (1996) The Mechanisms of Action of NSAIDs in Analgesia. *Drugs* 52:13–23. <https://doi.org/10.2165/00003495-199600525-00004>
55. Vane JR (1971) Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. *Nature New Biol* 231:232–235. <https://doi.org/10.1038/newbio231232a0>
56. Li W, Zheng X, Tu G, et al (2021) Novel aqueous biphasic system based on ionic liquid for the simultaneous extraction of seven active pharmaceutical ingredients in aquatic environment. *Environ Sci Pollut Res Int* 28:17853–17864. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11751-7>
57. Paíga P, Santos LHMLM, Ramos S, et al (2016) Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. *Sci Total Environ* 573:164–177. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.089>
58. Amos Sibeko P, Naicker D, Mdluli PS, Madikizela LM (2019) Naproxen, ibuprofen, and diclofenac residues in river water, sediments and *Eichhornia crassipes* of Mbokodweni river in South Africa: An initial screening. *Environ Forensics* 20:129–138. <https://doi.org/10.1080/15275922.2019.1597780>
59. Vulliet E, Cren-Olivé C (2011) Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environ Pollut* 159:2929–2934. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.033>

60. Shanmugam G, Sampath S, Selvaraj KK, et al (2014) Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Indian rivers. *Environ Sci Pollut Res* 21:921–931. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1957-6>
61. Hammad HM, Zia F, Bakhat HF, et al (2018) Uptake and toxicological effects of pharmaceutical active compounds on maize. *Agric Ecosyst Environ* 258:143–148. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.02.022>
62. Wang H, Wang X, Zhao J, et al (2020) Low protein diet supplemented with crystalline amino acids suppressing appetite and apo-lipoprotein synthesis in laying hens. *Anim Feed Sci Technol* 266:114533. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114533>
63. Reygaert WC (2018) An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol* 4:482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
64. Kulik K, Lenart-Boroń A, Wyrzykowska K (2023) Impact of Antibiotic Pollution on the Bacterial Population within Surface Water with Special Focus on Mountain Rivers. *Water* 15:975. <https://doi.org/10.3390/w15050975>
65. Ciślak M, Kruszelnicka I, Zembrzuska J, Ginter-Kramarczyk D (2023) Estrogen pollution of the European aquatic environment: A critical review. *Water Res* 229:119413. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119413>
66. Gonsioroski A, Mourikes VE, Flaws JA (2020) Endocrine Disruptors in Water and Their Effects on the Reproductive System. *Int J Mol Sci* 21:1929. <https://doi.org/10.3390/ijms21061929>
67. Cooke PS, Mesa AM, Sirohi VK, Levin ER (2021) Role of nuclear and membrane estrogen signaling pathways in the male and female reproductive tract. *Differentiation* 118:24–33. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2020.11.002>
68. Gabet-Giraud V, Miège C, Choubert JM, et al (2010) Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants. *Sci Total Environ* 408:4257–4269. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.05.023>
69. Adeel M, Song X, Wang Y, et al (2017) Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environ Int* 99:107–119. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>
70. Jiang J-Q, Zhou Z, Sharma VK (2013) Occurrence, transportation, monitoring and treatment of emerging micro-pollutants in waste water — A review from global views. *Microchem J* 110:292–300. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.04.014>
71. Jørgensen N, Joensen UN, Jensen TK, et al (2012) Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men. *BMJ Open* 2:e000990. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-000990>
72. Teta C, Holbech BF, Norrgren L, Naik YS (2018) Occurrence of oestrogenic pollutants and widespread feminisation of male tilapia in peri-urban dams in Bulawayo, Zimbabwe. *Afr J Aquat Sci* 43:17–26. <https://doi.org/10.2989/16085914.2017.1423269>
73. Karki NP, Colombo RE, Gaines KF, Maia A (2021) Exposure to 17β estradiol causes erosion of sexual dimorphism in Bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Environ Sci Pollut Res* 28:6450–6458. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10935-5>

74. Galea S, Merchant RM, Lurie N (2020) The Mental Health Consequences of COVID-19 and Physical Distancing: The Need for Prevention and Early Intervention. *JAMA Intern Med* 180:817–818. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.1562>
75. Flament J, Scius N, Zdanowicz N, et al (2021) Influence of post-COVID-19 deconfinement on psychiatric visits to the emergency department. *Am J Emerg Med* 48:238–242. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2021.05.014>
76. Jacob L, Bohlken J, Kostev K (2021) What have we learned in the past year? A study on pharmacy purchases of psychiatric drugs from wholesalers in the days prior to the first and second COVID-19 lockdowns in Germany. *J Psychiatr Res* 140:346–349. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2021.05.073>
77. Teymoorian T, Teymourian T, Kowsari E, Ramakrishna S (2021) Direct and indirect effects of SARS-CoV-2 on wastewater treatment. *J Water Process Eng* 42:102193. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102193>
78. Hernández Martínez SA, Melchor-Martínez EM, González-González RB, et al (2023) Environmental concerns and bioaccumulation of psychiatric drugs in water bodies – Conventional versus biocatalytic systems of mitigation. *Environ Res* 229:115892. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115892>
79. Ågerstrand M, Arnold K, Balshine S, et al (2020) Emerging investigator series: use of behavioural endpoints in the regulation of chemicals. *Environ Sci Process Impacts* 22:49–65. <https://doi.org/10.1039/c9em00463g>
80. Ford AT (2014) From gender benders to brain benders (and beyond!). *Aquat Toxicol Amst Neth* 151:1–3. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.005>
81. Gunnarsson L, Jauhainen A, Kristiansson E, et al (2008) Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environ Sci Technol* 42:5807–5813. <https://doi.org/10.1021/es8005173>
82. Stewart A, Wu N, Cachat J, et al (2011) Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:1421–1431. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.035>
83. Whitlock SE, Pereira MG, Shore RF, et al (2018) Environmentally relevant exposure to an antidepressant alters courtship behaviours in a songbird. *Chemosphere* 211:17–24. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.074>
84. Kaushik G, Thomas MA (2019) The potential association of psychoactive pharmaceuticals in the environment with human neurological disorders. *Sustain Chem Pharm* 13:100148. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100148>
85. Huggett DB, Khan IA, Foran CM, Schlenk D (2003) Determination of beta-adrenergic receptor blocking pharmaceuticals in United States wastewater effluent. *Environ Pollut* 121:199–205. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00226-9](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00226-9)
86. Cleuvers M (2005) Initial risk assessment for three β -blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* 59:199–205. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.090>

87. Küster A, Alder AC, Escher BI, et al (2010) Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in the European Union: A case study with the β -blocker atenolol. *Integr Environ Assess Manag* 6:514–523. https://doi.org/10.1897/IEAM_2009-050.1
88. Maszkowska J, Stolte S, Kumirska J, et al (2014) Beta-blockers in the environment: Part II. Ecotoxicity study. *Sci Total Environ* 493:1122–1126. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.039>
89. Santos LHMLM, Araújo AN, Fachini A, et al (2010) Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater* 175:45–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>
90. el-Sayed MG, el-Sayed MT, Elazab Abd el S, et al (1998) Effects of some beta-adrenergic blockers on male fertility parameters in rats. *DTW Dtsch Tierärztl Wochenschr* 105:10–12
91. Rosen RC, Kostis JB, Jekelis AW (1988) Beta-blocker effects on sexual function in normal males. *Arch Sex Behav* 17:241–255. <https://doi.org/10.1007/BF01541742>
92. Bialer M (2012) Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs). *Adv Drug Deliv Rev* 64:887–895. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.006>
93. Zhang Y, Geissen S-U, Gal C (2008) Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73:1151–1161. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>
94. Ternes TA (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res* 32:3245–3260. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00099-2)
95. Clara M, Strenn B, Kreuzinger N (2004) Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Res* 38:947–954. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.058>
96. Santarivová M, Zadinová K, Vostrá-Vydrová H, et al (2023) Effect of Environmental Concentration of Carbamazepine on the Behaviour and Gene Expression of Laboratory Rats. *Anim Open Access J MDPI* 13:2097. <https://doi.org/10.3390/ani13132097>
97. Pomati F, Castiglioni S, Zuccato E, et al (2006) Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells. *Environ Sci Technol* 40:2442–2447. <https://doi.org/10.1021/es051715a>
98. Calcagno E, Durando P, Valdés ME, et al (2016) Effects of carbamazepine on cortisol levels and behavioral responses to stress in the fish *Jenynsia multidentata*. *Physiol Behav* 158:68–75. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.02.025>
99. Nassef M, Matsumoto S, Seki M, et al (2010) Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 80:1095–1100. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.073>
100. Sauer N, Szlasa W, Jonderko L, et al (2022) Contrast Media Adverse Drug Reactions in Highly Polluted Environment. *Int J Environ Res Public Health* 19:7077. <https://doi.org/10.3390/ijerph19127077>

101. Li M, Zhang T-Y, Xu B, et al (2021) Iodinated trihalomethanes formation in iopamidol-contained water during ferrate/chlor(am)ination treatment. *Chemosphere* 272:129568. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129568>
102. Plewa MJ, Wagner ED, Richardson SD, et al (2004) Chemical and biological characterization of newly discovered iodoacid drinking water disinfection byproducts. *Environ Sci Technol* 38:4713–4722. <https://doi.org/10.1021/es049971v>
103. Ternes TA, Hirsch R (2000) Occurrence and Behavior of X-ray Contrast Media in Sewage Facilities and the Aquatic Environment. *Environ Sci Technol* 34:2741–2748. <https://doi.org/10.1021/es991118m>
104. Barber M (1961) Hospital infection yesterday and today. *J Clin Pathol* 14:2–10. <https://doi.org/10.1136/jcp.14.1.2>
105. Davies J (2006) Where have All the Antibiotics Gone? *Can J Infect Dis Med Microbiol J Can Mal Infect Microbiol Medicale* 17:287–290. <https://doi.org/10.1155/2006/707296>
106. Barber M (1947) Staphylococcal infection due to penicillin-resistant strains. *Br Med J* 2:863–865. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4534.863>
107. (2009) ECDC/EMEA Joint Technical Report: The bacterial challenge: time to react. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/ecdcemea-joint-technical-report-bacterial-challenge-time-react>. Accessed 30 Dec 2023
108. Davies SC, Fowler T, Watson J, et al (2013) Annual Report of the Chief Medical Officer: infection and the rise of antimicrobial resistance. *Lancet Lond Engl* 381:1606–1609. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60604-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60604-2)
109. Solomon SL, Oliver KB (2014) Antibiotic Resistance Threats in the United States: Stepping Back from the Brink. *Am Fam Physician* 89:938–941
110. Neu HC (1992) The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257:1064–1073. <https://doi.org/10.1126/science.257.5073.1064>
111. Bush K, Courvalin P, Dantas G, et al (2011) Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 9:894–896. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2693>
112. Tao S, Chen H, Li N, et al (2022) The Spread of Antibiotic Resistance Genes In Vivo Model. *Can J Infect Dis Med Microbiol J Can Mal Infect Microbiol Médicale* 2022:3348695. <https://doi.org/10.1155/2022/3348695>
113. Bennett PM (2008) Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 153:S347–S357. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707607>
114. Darphorn TS, Bel K, Koenders-van Sint Anneland BB, et al (2021) Antibiotic resistance plasmid composition and architecture in *Escherichia coli* isolates from meat. *Sci Rep* 11:2136. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81683-w>
115. Colavecchio A, Cadieux B, Lo A, Goodridge LD (2017) Bacteriophages Contribute to the Spread of Antibiotic Resistance Genes among Foodborne Pathogens of the Enterobacteriaceae Family – A Review. *Front Microbiol* 8:

116. Jeon JH, Jang K-M, Lee JH, et al (2023) Transmission of antibiotic resistance genes through mobile genetic elements in *Acinetobacter baumannii* and gene-transfer prevention. *Sci Total Environ* 857:159497. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159497>
117. Coculescu B-I (2009) Antimicrobial resistance induced by genetic changes. *J Med Life* 2:114–123
118. Martinez JL (2014) General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol* 11:33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
119. Reygaert W (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): molecular aspects of antimicrobial resistance and virulence. *Clin Lab Sci J Am Soc Med Technol* 22:115–119
120. Cox G, Wright GD (2013) Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol IJMM* 303:287–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>
121. Lippert TH, Ruoff H-J, Volm M (2008) Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors. The main reason for therapeutic failure. *Arzneimittelforschung* 58:261–264. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296504>
122. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S (2010) The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
123. Blair JMA, Richmond GE, Piddock LJV (2014) Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol* 9:1165–1177. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.66>
124. Lambert PA (2002) Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol* 92 Suppl:46S-54S
125. Miller WR, Munita JM, Arias CA (2014) Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther* 12:1221–1236. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.956092>
126. Gill MJ, Simjee S, Al-Hattawi K, et al (1998) Gonococcal resistance to beta-lactams and tetracycline involves mutation in loop 3 of the porin encoded at the *penB* locus. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2799–2803. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.11.2799>
127. Cornaglia G, Mazzariol A, Fontana R, Satta G (1996) Diffusion of carbapenems through the outer membrane of enterobacteriaceae and correlation of their activities with their periplasmic concentrations. *Microb Drug Resist Larchmt N* 2:273–276. <https://doi.org/10.1089/mdr.1996.2.273>
128. Kumar A, Schweizer HP (2005) Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev* 57:1486–1513. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.004>
129. Van Acker H, Van Dijck P, Coenye T (2014) Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends Microbiol* 22:326–333. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.001>
130. Mah T-F (2012) Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol* 7:1061–1072. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.76>
131. Bébéar CM, Pereyre S (2005) Mechanisms of drug resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. *Curr Drug Targets Infect Disord* 5:263–271. <https://doi.org/10.2174/15680050504880109>

132. Beceiro A, Tomás M, Bou G (2013) Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? Clin Microbiol Rev 26:185–230. <https://doi.org/10.1128/CMR.00059-12>
133. Kumar S, Mukherjee MM, Varela MF (2013) Modulation of Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps of the Major Facilitator Superfamily. Int J Bacteriol 2013:204141. <https://doi.org/10.1155/2013/204141>
134. Roberts MC (2003) Tetracycline therapy: update. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 36:462–467. <https://doi.org/10.1086/367622>
135. Roberts MC (2004) Resistance to macrolide, lincosamide, streptogramin, ketolide, and oxazolidinone antibiotics. Mol Biotechnol 28:47–62. <https://doi.org/10.1385/MB:28:1:47>
136. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV (2014) Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. Trends Microbiol 22:438–445. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>
137. Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O (1995) Trimethoprim and sulfonamide resistance. Antimicrob Agents Chemother 39:279–289. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.2.279>
138. Vedantam G, Guay GG, Austria NE, et al (1998) Characterization of mutations contributing to sulfathiazole resistance in Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother 42:88–93. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.1.88>
139. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, et al (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol 13:42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
140. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A (2004) Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. FEMS Microbiol Rev 28:519–542. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>
141. Ramirez MS, Tolmasky ME (2010) Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother 13:151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003>
142. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, et al (2006) Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med 12:83–88. <https://doi.org/10.1038/nm1347>
143. Sharma A, Gupta VK, Pathania R (2019) Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. Indian J Med Res 149:129–145. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2079_17
144. Soto SM (2013) Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. Virulence 4:223–229. <https://doi.org/10.4161/viru.23724>
145. Tanabe M, Szakonyi G, Brown KA, et al (2009) The multidrug resistance efflux complex, EmrAB from Escherichia coli forms a dimer in vitro. Biochem Biophys Res Commun 380:338–342. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.081>
146. Jo I, Hong S, Lee M, et al (2017) Stoichiometry and mechanistic implications of the MacAB-TolC tripartite efflux pump. Biochem Biophys Res Commun 494:668–673. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.102>

147. Jonas BM, Murray BE, Weinstock GM (2001) Characterization of emeA, a NorA homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3574–3579. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3574-3579.2001>
148. Truong-Bolduc QC, Dunman PM, Strahilevitz J, et al (2005) MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 187:2395–2405. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2395-2405.2005>
149. Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I (2013) Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiol J* 7:59–71. <https://doi.org/10.2174/1874285801307010059>
150. Kourtesi C, Ball AR, Huang Y-Y, et al (2013) Microbial efflux systems and inhibitors: approaches to drug discovery and the challenge of clinical implementation. *Open Microbiol J* 7:34–52. <https://doi.org/10.2174/1874285801307010034>
151. Poole K (2007) Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med* 39:162–176. <https://doi.org/10.1080/07853890701195262>
152. Piddock LJV (2006) Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 19:382–402. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006>
153. Qiu J, Zhao T, Liu Q, et al (2016) Residual veterinary antibiotics in pig excreta after oral administration of sulfonamides. *Environ Geochem Health* 38:549–556. <https://doi.org/10.1007/s10653-015-9740-x>
154. Tzeng T-W, Liu Y-T, Deng Y, et al (2016) Removal of sulfamethazine antibiotics using cow manure-based carbon adsorbents. *Int J Environ Sci Technol* 13:973–984. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0929-4>
155. Xiong W, Sun Y, Zhang T, et al (2015) Antibiotics, Antibiotic Resistance Genes, and Bacterial Community Composition in Fresh Water Aquaculture Environment in China. *Microb Ecol* 70:425–432. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0583-x>
156. Kovalakova P, Cizmas L, McDonald TJ, et al (2020) Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. *Chemosphere* 251:126351. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126351>
157. Yang W, Tang Z, Zhou F, et al (2013) Toxicity studies of tetracycline on *Microcystis aeruginosa* and *Selenastrum capricornutum*. *Environ Toxicol Pharmacol* 35:320–324. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.01.006>
158. Brain RA, Ramirez AJ, Fulton BA, et al (2008) Herbicidal effects of sulfamethoxazole in *Lemna gibba*: using p-aminobenzoic acid as a biomarker of effect. *Environ Sci Technol* 42:8965–8970. <https://doi.org/10.1021/es801611a>
159. Wang N, Nkejabega N, Hien N-N, et al (2009) Adverse effects of enrofloxacin when associated with environmental stress in Tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Chemosphere* 77:1577–1584. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.038>
160. Lin T, Chen Y, Chen W (2013) Impact of toxicological properties of sulfonamides on the growth of zebrafish embryos in the water. *Environ Toxicol Pharmacol* 36:1068–1076. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.09.009>

161. Zhou J, Yun X, Wang J, et al (2022) A review on the ecotoxicological effect of sulphonamides on aquatic organisms. *Toxicol Rep* 9:534–540. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.03.034>
162. Wu W, Xu J, Dou Y, et al (2021) Bioaccumulation of Pyraoxystrobin and Its Predictive Evaluation in Zebrafish. *Toxics* 10:5. <https://doi.org/10.3390/toxics10010005>
163. Hiba A, Carine A, Haifa AR, et al (2016) Monitoring of twenty-two sulfonamides in edible tissues: Investigation of new metabolites and their potential toxicity. *Food Chem* 192:212–227. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.093>
164. KołECKa K, Gajewska M, Stepnowski P, Caban M (2019) Spatial distribution of pharmaceuticals in conventional wastewater treatment plant with Sludge Treatment Reed Beds technology. *Sci Total Environ* 647:149–157. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.439>
165. Sinclair CJ, Boxall ABA (2003) Assessing the ecotoxicity of pesticide transformation products. *Environ Sci Technol* 37:4617–4625. <https://doi.org/10.1021/es030038m>
166. Barbash JE (2014) 11.15 - The Geochemistry of Pesticides. In: Holland HD, Turekian KK (eds) *Treatise on Geochemistry (Second Edition)*. Elsevier, Oxford, pp 535–572
167. Karcher W, Devillers J (1990) *Practical Applications of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in Environmental Chemistry and Toxicology*. Springer Science & Business Media
168. Hutson DH, Roberts TR (1986) *Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Insecticides*. Wiley
169. Zhou S-X, Li X-F (2019) Interfacial debonding of an orthotropic half-plane bonded to a rigid foundation. *Int J Solids Struct* 161:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijsolstr.2018.11.003>
170. Petrie B, Barden R, Kasprzyk-Hordern B (2015) A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res* 72:3–27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>
171. Montagner CC, de Medeiros JF, de Vilhena Araújo E, et al (2022) Chapter 12 - Pesticides in aquatic matrices in developing countries: What do we know so far? In: Dalu T, Tavengwa NT (eds) *Emerging Freshwater Pollutants*. Elsevier, pp 203–226
172. García-Galán MJ, Silvia Díaz-Cruz M, Barceló D (2008) Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. *TrAC - Trends Anal Chem* 27:1008–1022. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.10.001>
173. A D, Li L, Tai Y, et al (2020) Behavior assessment of sulfonamides and N4-acetyl sulfonamides from wastewater effluent in subsurface constructed wetlands: Removal, distribution, and biotransformation. *Chem Eng J* 396:125252. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125252>
174. Hilton MJ, Thomas KV (2003) Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1015:129–141. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01213-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01213-5)
175. Díaz-Cruz MS, García-Galán MJ, Barceló D (2008) Highly sensitive simultaneous determination of sulfonamide antibiotics and one metabolite in environmental waters by liquid chromatography-

- quadrupole linear ion trap-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1193:50–59. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.029>
176. Vree TB, Kolmer EWJB, Martea M, et al (1990) High-performance liquid chromatography of sulphadimethoxine and its N1-glucuronide, N4-acetyl and N4-acetyl-N1-glucuronide metabolites in human plasma and urine. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 526:119–128. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)82489-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)82489-5)
177. Hoff RB, Meneghini L, Pizzolato TM, et al (2014) Structural elucidation of sulfaquinoxaline metabolism products and their occurrence in biological samples using high-resolution orbitrap mass spectrometry. *Anal Chem* 86:5579–5586. <https://doi.org/10.1021/ac501132r>
178. World Health Organization Surveillance, Prevention and Control team (2018) WHO report on surveillance of antibiotic consumption. Geneva
179. World Health Organization (2022) World leaders and experts call for action to protect the environment from antimicrobial pollution. Geneva, Nairobi, Paris, Rome
180. Kaza S, Yao LC, Bhada-Tata P, Van Woerden F (2018) What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. Washington, DC: World Bank
181. González-González RB, Martínez-Zamudio LY, Hernández JAR, et al (2023) Pharmaceutical pollution fingerprinting and waterbodies remediation using waste-derived carbon dots as sustainable advanced nanomaterials. *Environ Res* 238:117180. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117180>
182. Cuerda-Correa EM, Alexandre-Franco MF, Fernández-González C (2020) Advanced Oxidation Processes for the Removal of Antibiotics from Water. An Overview. *Water* 12:102. <https://doi.org/10.3390/w12010102>
183. Rivera-Utrilla J, Sánchez-Polo M, Ferro-García MÁ, et al (2013) Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* 93:1268–1287. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.059>
184. Oller I, Malato S, Sánchez-Pérez JA (2011) Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination—A review. *Sci Total Environ* 409:4141–4166. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.08.061>
185. Homem V, Santos L (2011) Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices – A review. *J Environ Manage* 92:2304–2347. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.05.023>
186. Esplugas S, Bila DM, Krause LGT, Dezotti M (2007) Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *J Hazard Mater* 149:631–642. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.073>
187. Ikehata K, Jodeiri Naghashkar N, Gamal El-Din M (2006) Degradation of Aqueous Pharmaceuticals by Ozonation and Advanced Oxidation Processes: A Review. *Ozone Sci Eng* 28:353–414. <https://doi.org/10.1080/01919510600985937>
188. Jain B, Singh AK, Kim H, et al (2018) Treatment of organic pollutants by homogeneous and heterogeneous Fenton reaction processes. *Environ Chem Lett* 16:947–967. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0738-3>

189. Yan S, Song W (2014) Photo-transformation of pharmaceutically active compounds in the aqueous environment: a review. *Environ Sci Process Impacts* 16:697–720. <https://doi.org/10.1039/C3EM00502J>
190. Ma H, Wang X, Jin R, et al (2023) Promote hydroxyl radical and key intermediates formation for deep toluene mineralization via unique electron transfer channel. *J Colloid Interface Sci* 630:704–713. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.10.160>
191. Zhang X, Wang J, Xiao B, et al (2022) Resin-based photo-self-Fenton system with intensive mineralization by the synergistic effect of holes and hydroxyl radicals. *Appl Catal B Environ* 315:121525. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2022.121525>
192. Tan M, Liu S, Chen N, et al (2022) Hydroxyl radicals induced mineralization of organic carbon during oxygenation of ferrous mineral-organic matter associations: Adsorption versus coprecipitation. *Sci Total Environ* 816:151667. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151667>
193. Legrini O, Oliveros E, Braun AM (1993) Photochemical processes for water treatment. *Chem Rev* 93:671–698. <https://doi.org/10.1021/cr00018a003>
194. Malley J, Bowen A, White M, et al (2020) UV Photolysis, AOPs and/or Biofiltration for Micropollutants in Water Reuse
195. Wang D, Junker AL, Sillanpää M, et al (2023) Photo-Based Advanced Oxidation Processes for Zero Pollution: Where Are We Now? *Engineering* 23:19–23. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.08.005>
196. Anisuzzaman SM, Joseph CG, Pang CK, et al (2022) Current Trends in the Utilization of Photolysis and Photocatalysis Treatment Processes for the Remediation of Dye Wastewater: A Short Review. *ChemEngineering* 6:58. <https://doi.org/10.3390/chemengineering6040058>
197. Oppenländer T (2003) Photochemical Purification of Water and Air: Advanced Oxidation Processes (AOPs); Principles, Reaction Mechanisms, Reactor Concepts. Wiley-VCH, Weinheim
198. Ye Y, Bruning H, Yntema D, et al (2017) Homogeneous photosensitized degradation of pharmaceuticals by using red light LED as light source and methylene blue as photosensitizer. *Chem Eng J* 316:872–881. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.053>
199. Calza P, Vione D, Novelli A, et al (2012) The role of nitrite and nitrate ions as photosensitizers in the phototransformation of phenolic compounds in seawater. *Sci Total Environ* 439:67–75. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.009>
200. Wang B, Wang X, Hu Y, et al (2015) The combined effects of UV-C radiation and H₂O₂ on *Microcystis aeruginosa*, a bloom-forming cyanobacterium. *Chemosphere* 141:34–43. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.020>
201. Salim MMFF, Novack A, Soares PA, et al (2016) Photochemical UVC/H₂O₂ oxidation system as an effective method for the decolourisation of bio-treated textile wastewaters: towards onsite water reuse. *RSC Adv* 6:90631–90645. <https://doi.org/10.1039/C6RA15615K>
202. Baxendale JH, Wilson JA (1957) The photolysis of hydrogen peroxide at high light intensities. *Trans Faraday Soc* 53:344–356. <https://doi.org/10.1039/TF9575300344>

203. Goldstein S, Aschengrau D, Diamant Y, Rabani J (2007) Photolysis of Aqueous H₂O₂: Quantum Yield and Applications for Polychromatic UV Actinometry in Photoreactors. *Environ Sci Technol* 41:7486–7490. <https://doi.org/10.1021/es071379t>
204. Bielski BHJ, Cabelli DE, Arudi RL, Ross AB (1985) Reactivity of HO₂/O⁻ 2 Radicals in Aqueous Solution. *J Phys Chem Ref Data* 14:1041–1100. <https://doi.org/10.1063/1.555739>
205. Ross F, Ross AB (1977) Selected specific rates of reactions of transients from water in aqueous solution. III. Hydroxyl radical and perhydroxyl radical and their radical ions. Notre Dame Univ., IN (USA). Radiation Lab.
206. Cédât B, de Brauer C, Métivier H, et al (2016) Are UV photolysis and UV/H₂O₂ process efficient to treat estrogens in waters? Chemical and biological assessment at pilot scale. *Water Res* 100:357–366. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.040>
207. Sun Y, Cho D-W, Graham NJD, et al (2019) Degradation of antibiotics by modified vacuum-UV based processes: Mechanistic consequences of H₂O₂ and K₂S₂O₈ in the presence of halide ions. *Sci Total Environ* 664:312–321. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.006>
208. Li W, Xu X, Lyu B, et al (2019) Degradation of typical macrolide antibiotic roxithromycin by hydroxyl radical: kinetics, products, and toxicity assessment. *Environ Sci Pollut Res* 26:14570–14582. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04713-1>
209. Zhang R, Yang Y, Huang C-H, et al (2016) Kinetics and modeling of sulfonamide antibiotic degradation in wastewater and human urine by UV/H₂O₂ and UV/PDS. *Water Res* 103:283–292. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.037>
210. Buxton GV, Greenstock CL, Helman WP, Ross AB (1988) Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$ in Aqueous Solution. *J Phys Chem Ref Data* 17:513–886. <https://doi.org/10.1063/1.555805>
211. Barbusinski K (2009) Fenton reaction - Controversy concerning the chemistry. *Ecol Chem Eng S* 16:347–358
212. Navalon S, Alvaro M, Garcia H (2010) Heterogeneous Fenton catalysts based on clays, silicas and zeolites. *Appl Catal B Environ* 99:1–26. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.07.006>
213. Gupta A, Garg A (2018) Degradation of ciprofloxacin using Fenton's oxidation: Effect of operating parameters, identification of oxidized by-products and toxicity assessment. *Chemosphere* 193:1181–1188. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.046>
214. Salari M, Rakhshandehroo GR, Nikoo MR (2018) Degradation of ciprofloxacin antibiotic by Homogeneous Fenton oxidation: Hybrid AHP-PROMETHEE method, optimization, biodegradability improvement and identification of oxidized by-products. *Chemosphere* 206:157–167. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.086>
215. Esteves BM, Rodrigues CSD, Madeira LM (2019) Wastewater Treatment by Heterogeneous Fenton-Like Processes in Continuous Reactors. In: Gil A, Galeano LA, Vicente MÁ (eds) *Applications of Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Drinking Water Treatment*. Springer International Publishing, Cham, pp 211–255
216. Printing Effluent Treatment. In: [indiamart.com](https://m.indiamart.com/proddetail/printing-effluent-treatment-12196786855.html). <https://m.indiamart.com/proddetail/printing-effluent-treatment-12196786855.html>. Accessed 31 Dec 2023

217. Wang S, Wang J (2017) Comparative study on sulfamethoxazole degradation by Fenton and Fe(II)-activated persulfate process. RSC Adv 7:48670–48677. <https://doi.org/10.1039/C7RA09325J>
218. Sedlak DL, Andren AW (1991) Oxidation of chlorobenzene with Fenton's reagent. Environ Sci Technol 25:777–782. <https://doi.org/10.1021/es00016a024>
219. Pignatello JJ (1992) Dark and photoassisted iron(3+)-catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. Environ Sci Technol 26:944–951. <https://doi.org/10.1021/es00029a012>
220. Litter MI, Slodowicz M (2017) An overview on heterogeneous Fenton and photoFenton reactions using zerovalent iron materials. J Adv Oxid Technol 20:. <https://doi.org/10.1515/jaots-2016-0164>
221. Bossmann SH, Oliveros E, Göb S, et al (1998) New Evidence against Hydroxyl Radicals as Reactive Intermediates in the Thermal and Photochemically Enhanced Fenton Reactions. J Phys Chem A 102:5542–5550. <https://doi.org/10.1021/jp980129j>
222. Giri AS, Golder AK (2019) Ciprofloxacin degradation in photo-Fenton and photo-catalytic processes: Degradation mechanisms and iron chelation. J Environ Sci 80:82–92. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.09.016>
223. Giraldo-Aguirre AL, Serna-Galvis EA, Erazo-Erazo ED, et al (2018) Removal of β -lactam antibiotics from pharmaceutical wastewaters using photo-Fenton process at near-neutral pH. Environ Sci Pollut Res 25:20293–20303. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8420-z>
224. Wardenier N, Liu Z, Nikiforov A, et al (2019) Micropollutant elimination by O₃, UV and plasma-based AOPs: An evaluation of treatment and energy costs. Chemosphere 234:715–724. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.033>
225. Suzuki H, Araki S, Yamamoto H (2015) Evaluation of advanced oxidation processes (AOP) using O₃, UV, and TiO₂ for the degradation of phenol in water. J Water Process Eng 7:54–60. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2015.04.011>
226. GRV12-EP Industrial Ozone Generator. In: Ing. OZONO SLU. <https://www.zonosistem.com/shop/product/fabgrv-0025-grv12-ep-industrial-ozone-generator-6763>. Accessed 31 Dec 2023
227. Singh H, Mishra BK (2022) Chapter 20 - Recent applications, reaction mechanism, and future perspective of hybrid ozonation process for water and wastewater treatment. In: Shah M, Rodriguez-Couto S, Biswas J (eds) Development in Wastewater Treatment Research and Processes. Elsevier, pp 459–484
228. Stylianou SK, Katsoyiannis IA, Mitrakas M, Zouboulis AI (2018) Application of a ceramic membrane contacting process for ozone and peroxone treatment of micropollutant contaminated surface water. J Hazard Mater 358:129–135. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.06.060>
229. Alsager OA, Alnajrani MN, Abuelizz HA, Aldaghmani IA (2018) Removal of antibiotics from water and waste milk by ozonation: kinetics, byproducts, and antimicrobial activity. Ecotoxicol Environ Saf 158:114–122. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.024>
230. Witte BD, Langenhove HV, Hemelsoet K, et al (2009) Levofloxacin ozonation in water: Rate determining process parameters and reaction pathway elucidation. Chemosphere 76:683–689. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.03.048>

231. Huber MM, Canonica S, Park G-Y, von Gunten U (2003) Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation and Advanced Oxidation Processes. *Environ Sci Technol* 37:1016–1024. <https://doi.org/10.1021/es025896h>
232. Dantas RF, Contreras S, Sans C, Esplugas S (2008) Sulfamethoxazole abatement by means of ozonation. *J Hazard Mater* 150:790–794. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.034>
233. Kim T-H, Kim SD, Kim HY, et al (2012) Degradation and toxicity assessment of sulfamethoxazole and chlortetracycline using electron beam, ozone and UV. *J Hazard Mater* 227–228:237–242. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.038>
234. Kusic H, Koprivanac N, Bozic AL (2006) Minimization of organic pollutant content in aqueous solution by means of AOPs: UV- and ozone-based technologies. *Chem Eng J* 123:127–137. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2006.07.011>
235. Collivignarelli C, Sorlini S (2004) AOPs with ozone and UV radiation in drinking water: contaminants removal and effects on disinfection byproducts formation. *Water Sci Technol* 49:51–56. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0218>
236. Peyton GR, Glaze WH (1988) Destruction of pollutants in water with ozone in combination with ultraviolet radiation. 3. Photolysis of aqueous ozone. *Environ Sci Technol* 22:761–767. <https://doi.org/10.1021/es00172a003>
237. Litter MI, Quici N Photochemical Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment. *Recent Pat Eng* 4:217–241
238. Takeda K, Fujisawa K, Nojima H, et al (2017) Hydroxyl radical generation with a high power ultraviolet light emitting diode (UV-LED) and application for determination of hydroxyl radical reaction rate constants. *J Photochem Photobiol Chem* 340:8–14. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.02.020>
239. Lester Y, Avisar D, Gozlan I, Mamane H (2011) Removal of pharmaceuticals using combination of UV/H₂O₂/O₃ advanced oxidation process. *Water Sci Technol* 64:2230–2238. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.079>
240. Beltrán FJ, Aguinaco A, García-Araya JF, Oropesa A (2008) Ozone and photocatalytic processes to remove the antibiotic sulfamethoxazole from water. *Water Res* 42:3799–3808. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.07.019>
241. Paucar NE, Kim Ii, Tanaka H, Sato C (2019) Effect of O₃ Dose on the O₃/UV Treatment Process for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Secondary Effluent. *ChemEngineering* 3:53. <https://doi.org/10.3390/chemengineering3020053>
242. Nakamura K, Refojo MF, Crabtree DV, et al (1991) Ocular toxicity of low-molecular-weight components of silicone and fluorosilicone oils. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:3007–3020
243. Sun Z, Wang X, Liu C, et al (2021) Persistent Free Radicals from Low-Molecular-Weight Organic Compounds Enhance Cross-Coupling Reactions and Toxicity of Anthracene on Amorphous Silica Surfaces under Light. *Environ Sci Technol* 55:3716–3726. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07472>
244. Wen Y, Pan S, Luo X, et al (2009) A Biodegradable Low Molecular Weight Polyethylenimine Derivative as Low Toxicity and Efficient Gene Vector. *Bioconjug Chem* 20:322–332. <https://doi.org/10.1021/bc800428y>

245. Glaze WH, Beltran F, Tuhkanen T, Kang J-W (1992) Chemical Models of Advanced Oxidation Processes. *Water Qual Res J* 27:23–42. <https://doi.org/10.2166/wqrj.1992.002>
246. Rosal R, Rodríguez A, Perdigón-Melón JA, et al (2008) Removal of pharmaceuticals and kinetics of mineralization by O₃/H₂O₂ in a biotreated municipal wastewater. *Water Res* 42:3719–3728. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.06.008>
247. De Witte B, Dewulf J, Demeestere K, Van Langenhove H (2009) Ozonation and advanced oxidation by the peroxone process of ciprofloxacin in water. *J Hazard Mater* 161:701–708. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.021>
248. Gomes DS, Gando-Ferreira LM, Quinta-Ferreira RM, Martins RC (2018) Removal of sulfamethoxazole and diclofenac from water: strategies involving O₃ and H₂O₂. *Environ Technol* 39:1658–1669. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1335351>
249. Liu Z, Hosseinzadeh S, Wardenier N, et al (2019) Combining ozone with UV and H₂O₂ for the degradation of micropollutants from different origins: lab-scale analysis and optimization. *Environ Technol* 40:3773–3782. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1491630>
250. Gorito AM, Pesqueira JFJR, Moreira NFF, et al (2021) Ozone-based water treatment (O₃, O₃/UV, O₃/H₂O₂) for removal of organic micropollutants, bacteria inactivation and regrowth prevention. *J Environ Chem Eng* 9:105315. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105315>
251. Lee H, Lee E, Lee C-H, Lee K (2011) Degradation of chlorotetracycline and bacterial disinfection in livestock wastewater by ozone-based advanced oxidation. *J Ind Eng Chem* 17:468–473. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2011.05.006>
252. Matatov-Meytal YI, Sheintuch M (1998) Catalytic abatement of water pollutants. *Ind Eng Chem Res* 37:. <https://doi.org/10.1021/ie9702439>
253. Gogate PR, Pandit AB (2004) A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Adv Environ Res* 8:501–551. [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(03\)00032-7](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(03)00032-7)
254. Su J-C, Wang Y-L, Su J-J (2019) Photocatalytic oxidation of dairy effluent with UV lamp or UV light-emitting diode module and biological treatment processes. *Int J Environ Sci Technol* 16:1047–1056. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1736-5>
255. Wang Q, Pang W, Mao Y, et al (2019) Study of the Degradation of Trimethoprim Using Photo-Fenton Oxidation Technology. *Water* 11:207. <https://doi.org/10.3390/w11020207>
256. Baird NC (1997) Free Radical Reactions in Aqueous Solutions: Examples from Advanced Oxidation Processes for Wastewater from the Chemistry in Airborne Water Droplets. *J Chem Educ* 74:817. <https://doi.org/10.1021/ed074p817>
257. Pirkanniemi K, Sillanpää M (2002) Heterogeneous water phase catalysis as an environmental application: a review. *Chemosphere* 48:1047–1060. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00168-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00168-6)
258. Gomes J, Lincho J, Domingues E, et al (2019) N–TiO₂ Photocatalysts: A Review of Their Characteristics and Capacity for Emerging Contaminants Removal. *Water* 11:373. <https://doi.org/10.3390/w11020373>

259. Wang N, Zheng T, Zhang G, Wang P (2016) A review on Fenton-like processes for organic wastewater treatment. *J Environ Chem Eng* 4:762–787. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.12.016>
260. Hao H, Shi J-L, Xu H, et al (2019) N-hydroxyphthalimide-TiO₂ complex visible light photocatalysis. *Appl Catal B Environ* 246:149–155. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.01.037>
261. Méndez-Medrano MG, Kowalska E, Lehoux A, et al (2016) Surface Modification of TiO₂ with Ag Nanoparticles and CuO Nanoclusters for Application in Photocatalysis. *J Phys Chem C* 120:5143–5154. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b10703>
262. Sanzone G, Zimbone M, Cacciato G, et al (2018) Ag/TiO₂ nanocomposite for visible light-driven photocatalysis. *Superlattices Microstruct* 123:394–402. <https://doi.org/10.1016/j.spmi.2018.09.028>
263. Xiong X, Xu Y (2016) Synergetic Effect of Pt and Borate on the TiO₂-Photocatalyzed Degradation of Phenol in Water. *J Phys Chem C* 120:3906–3912. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11923>
264. Wang D, Wang S, Li B, et al (2019) Tunable band gap of NV co-doped Ca:TiO₂B (CaTi₅O₁₁) for visible-light photocatalysis. *Int J Hydrog Energy* 44:4716–4723. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.12.223>
265. Du D, Shi W, Wang L, Zhang J (2017) Yolk-shell structured Fe₃O₄@void@TiO₂ as a photo-Fenton-like catalyst for the extremely efficient elimination of tetracycline. *Appl Catal B Environ* 200:484–492. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.07.043>
266. Gurkan YY, Kasapbasi E, Cinar Z (2013) Enhanced solar photocatalytic activity of TiO₂ by selenium(IV) ion-doping: Characterization and DFT modeling of the surface. *Chem Eng J* 214:34–44. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.10.025>
267. Eswar NK, Ramamurthy PC, Madras G (2016) Novel synergistic photocatalytic degradation of antibiotics and bacteria using V–N doped TiO₂ under visible light: the state of nitrogen in V-doped TiO₂. *New J Chem* 40:3464–3475. <https://doi.org/10.1039/C5NJ02861B>
268. Karabelas AJ, Plakas KV, Sarasidis VC (2018) Chapter 9 - How Far Are We From Large-Scale PMR Applications? In: Basile A, Mozia S, Molinari R (eds) *Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes*. Elsevier, pp 233–295
269. Plakas KV, Sarasidis VC, Patsios SI, et al (2016) Novel pilot scale continuous photocatalytic membrane reactor for removal of organic micropollutants from water. *Chem Eng J* 304:335–343. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.06.075>
270. Karabelas A, Sarasidis V, Plakas K, et al (2015) Novel Pilot Scale Continuous Photocatalytic Membrane Reactor for the Removal of Recalcitrant Micropollutants from Water
271. Karabelas A, Plakas K, Sarasidis V, Patsios S (2014) THE EFFECT OF HUMIC ACIDS ON THE REMOVAL OF ATRAZINE FROM WATER IN A CONTINUOUS PHOTOCATALYTIC MEMBRANE REACTOR. *GlobalNEST Vol* 16:516–524
272. Zheng X, Xu S, Wang Y, et al (2018) Enhanced degradation of ciprofloxacin by graphitized mesoporous carbon (GMC)-TiO₂ nanocomposite: Strong synergy of adsorption-photocatalysis and antibiotics degradation mechanism. *J Colloid Interface Sci* 527:202–213. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.05.054>

273. Serna-Galvis EA, Giraldo-Aguirre AL, Silva-Agreto J, et al (2017) Removal of antibiotic cloxacillin by means of electrochemical oxidation, TiO₂ photocatalysis, and photo-Fenton processes: analysis of degradation pathways and effect of the water matrix on the elimination of antimicrobial activity. *Environ Sci Pollut Res* 24:6339–6352. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6257-5>
274. Kulkarni A, Miller SE (2022) Chapter 2 - Analysis of pharmaceuticals in the environment. In: Török M (ed) *Contemporary Chemical Approaches for Green and Sustainable Drugs*. Elsevier, pp 27–45
275. Daverey A, Dutta K, Sarkar A (2019) Chapter 1 - An overview of analytical methodologies for environmental monitoring. In: Kaur Brar S, Hegde K, Pachapur VL (eds) *Tools, Techniques and Protocols for Monitoring Environmental Contaminants*. Elsevier, pp 3–17
276. Liu Q, Zhou Q, Jiang G (2014) Nanomaterials for analysis and monitoring of emerging chemical pollutants. *TrAC Trends Anal Chem* 58:10–22. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.02.014>
277. Guilbault GG, Hjelm M (1989) Nomenclature for automated and mechanised analysis (Recommendations 1989). *Pure Appl Chem* 61:1657–1664. <https://doi.org/10.1351/pac198961091657>
278. (1979) General Aspects of Trace Analytical Methods—IV. Recommendations for Nomenclature, Standard Procedures and Reporting of Experimental Data for Surface Analysis Techniques. *Pure Appl Chem* 51:2243–2250. <https://doi.org/10.1351/pac197951112243>
279. Ohoro CR, Adeniji AO, Okoh AI, Okoh OO (2019) Distribution and Chemical Analysis of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in the Environmental Systems: A Review. *Int J Environ Res Public Health* 16:3026. <https://doi.org/10.3390/ijerph16173026>
280. Jones-Lepp TL, Stevens R (2007) Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/sewage sludge: the interface between analytical chemistry and regulation. *Anal Bioanal Chem* 387:1173–1183. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0942-z>
281. Kim Y, Pipes WO, Chung P-G (1997) Estimation of suspended solids concentrations in activated sludge settling tanks. *Water Sci Technol* 35:127–135. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00159-5](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00159-5)
282. Kolpin DW, Skopec M, Meyer MT, et al (2004) Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Sci Total Environ* 328:119–130. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.01.015>
283. Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ (2008) The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Res* 42:3498–3518. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.04.026>
284. Lin K, Gan J (2011) Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere* 83:240–246. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.083>
285. Kumirska J, Łukaszewicz P, Caban M, et al (2019) Determination of twenty pharmaceutical contaminants in soil using ultrasound-assisted extraction with gas chromatography-mass spectrometric detection. *Chemosphere* 232:232–242. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.164>

286. Vazquez-Roig P, Segarra R, Blasco C, et al (2010) Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217:2471–2483. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.033>
287. Pan Y, Sha J, Zhou Z, Fürsich FT (2013) The Jehol Biota: Definition and distribution of exceptionally preserved relicts of a continental Early Cretaceous ecosystem. *Cretac Res* 44:30–38. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2013.03.007>
288. Huerta B, Rodríguez-Mozaz S, Barcelo D (2013) Chapter 6 - Analysis of Pharmaceutical Compounds in Biota. In: Petrovic M, Barcelo D, Pérez S (eds) *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, pp 169–193
289. Runnqvist H, Bak SA, Hansen M, et al (2010) Determination of pharmaceuticals in environmental and biological matrices using pressurised liquid extraction—Are we developing sound extraction methods? *J Chromatogr A* 1217:2447–2470. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.046>
290. Pavlović DM, Babić S, Horvat AJM, Kaštelan-Macan M (2007) Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *TrAC Trends Anal Chem* 26:1062–1075. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.09.010>
291. Kallio J-M, Lahti M, Oikari A, Kronberg L (2010) Metabolites of the Aquatic Pollutant Diclofenac in Fish Bile. *Environ Sci Technol* 44:7213–7219. <https://doi.org/10.1021/es903402c>
292. Lahti M, Brozinski J-M, Jylhä A, et al (2011) Uptake from water, biotransformation, and biliary excretion of pharmaceuticals by rainbow trout. *Environ Toxicol Chem* 30:1403–1411. <https://doi.org/10.1002/etc.501>
293. Mehinto AC, Hill EM, Tyler CR (2010) Uptake and Biological Effects of Environmentally Relevant Concentrations of the Nonsteroidal Anti-inflammatory Pharmaceutical Diclofenac in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Sci Technol* 44:2176–2182. <https://doi.org/10.1021/es903702m>
294. Owen SF, Huggett DB, Hutchinson TH, et al (2009) Uptake of propranolol, a cardiovascular pharmaceutical, from water into fish plasma and its effects on growth and organ biometry. *Aquat Toxicol* 93:217–224. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.05.009>
295. Wang M, Guo B, Huang Z, et al (2010) Improved compatibility of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry for tracing occurrence of barbitol homologous residues in animal tissues. *J Chromatogr A* 1217:2821–2831. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.042>
296. Contardo-Jara V, Lorenz C, Pflugmacher S, et al (2011) Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquat Toxicol* 105:428–437. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.07.017>
297. Chu S, Metcalfe CD (2007) Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1163:112–118. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.014>
298. Garcia SN, Foster M, Constantine LA, Huggett DB (2012) Field and laboratory fish tissue accumulation of the anti-convulsant drug carbamazepine. *Ecotoxicol Environ Saf* 84:207–211. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.013>

299. Ramirez AJ, Mottaleb MA, Brooks BW, Chambliss CK (2007) Analysis of Pharmaceuticals in Fish Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem* 79:3155–3163. <https://doi.org/10.1021/ac062215i>
300. Faroongsarng D, Chandumpai A, Chiayvareesajja S, Theapparatt Y (2007) Bioavailability and absorption analysis of oxytetracycline orally administered to the standardized moulting farmed Pacific white shrimps (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 269:89–97. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.019>
301. Writer JH, Ryan JN, Barber LB (2011) Role of Biofilms in Sorptive Removal of Steroidal Hormones and 4-Nonylphenol Compounds from Streams. *Environ Sci Technol* 45:7275–7283. <https://doi.org/10.1021/es2008038>
302. Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, et al (2005) Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ Toxicol Chem* 24:464–469. <https://doi.org/10.1897/04-081R.1>
303. Reddersen K, Heberer Th (2003) Formation of an artifact of diclofenac during acidic extraction of environmental water samples. *J Chromatogr A* 1011:221–226. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01173-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01173-7)
304. Azzouz A, Souhail B, Ballesteros E (2011) Determination of residual pharmaceuticals in edible animal tissues by continuous solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* 84:820–828. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.02.016>
305. Al-Ansari AM, Saleem A, Kimpe LE, et al (2011) The development of an optimized sample preparation for trace level detection of 17 α -ethinylestradiol and estrone in whole fish tissue. *J Chromatogr B* 879:3649–3652. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.033>
306. Barker M, Hengst M, Schmid J, et al (2006) Volatile organic compounds in the exhaled breath of young patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J Off J Eur Soc Clin Respir Physiol* 27:929–36. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00085105>
307. Petrovic M, Perez S, Barcelo D (2013) Analysis, Removal, Effects and Risk of Pharmaceuticals in the Water Cycle, 2nd ed
308. LaCourse WR (2017) HPLC Instrumentation. In: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier
309. Kazakevich YV, LoBrutto R (2007) HPLC for Pharmaceutical Scientists. John Wiley & Sons
310. Altria KD, Filbey SD (1993) Quantitative Pharmaceutical Analysis by Capillary Electrophoresis. *J Liq Chromatogr* 16:2281–2292. <https://doi.org/10.1080/10826079308020985>
311. Osbourn DM, Weiss DJ, Lunte CE (2000) On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* 21:2768–2779. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(20000801\)21:14<2768::AID-ELPS2768>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1522-2683(20000801)21:14<2768::AID-ELPS2768>3.0.CO;2-P)
312. Alshana U, Göger NG, Ertaş N (2013) Dispersive liquid–liquid microextraction combined with field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk and dairy products. *Food Chem* 138:890–897. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.121>

313. Dawod M, Breadmore MC, Guijt RM, Haddad PR (2008) Electrokinetic supercharging for on-line preconcentration of seven non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples. *J Chromatogr A* 1189:278–284. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.056>
314. Zhong S, Tan SN, Ge L, et al (2011) Determination of bisphenol A and naphthols in river water samples by capillary zone electrophoresis after cloud point extraction. *Talanta* 85:488–492. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.04.009>
315. Macià A, Borrull F, Calull M, et al (2008) Sensitivity enhancement for the analysis of naproxen in tap water by solid-phase extraction coupled in-line to capillary electrophoresis. *J Sep Sci* 31:872–880. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700593>
316. Przybylska A, Gackowski M, Koba M (2021) Application of Capillary Electrophoresis to the Analysis of Bioactive Compounds in Herbal Raw Materials. *Molecules* 26:2135. <https://doi.org/10.3390/molecules26082135>
317. Moschet C, Piazzoli A, Singer H, Hollender J (2013) Alleviating the reference standard dilemma using a systematic exact mass suspect screening approach with liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Anal Chem* 85:10312–10320. <https://doi.org/10.1021/ac4021598>
318. Stock NL (2017) Introducing Graduate Students to High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS) Using a Hands-On Approach. *J Chem Educ* 94:1978–1982. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00569>
319. Krauss M, Singer H, Hollender J (2010) LC–high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Anal Bioanal Chem* 397:943–951. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3608-9>
320. Anagnostopoulou K, Nannou C, Evgenidou E, Lambropoulou DA (2023) Does climbazole instigate a threat in the environment as persistent, mobile and toxic compound? Unveiling the occurrence and potential ecological risks of its phototransformation products in the water cycle. *J Hazard Mater* 458:131854. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131854>
321. Kosma CI, Lambropoulou DA, Albanis TA (2017) Photochemical transformation and wastewater fate and occurrence of omeprazole: HRMS for elucidation of transformation products and target and suspect screening analysis in wastewaters. *Sci Total Environ* 590–591:592–601. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.233>
322. Gad SC (2014) QSAR. In: Wexler P (ed) *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition). Academic Press, Oxford, pp 1–9
323. Massarsky A, Donnell MT, de Gandiaga E, et al (2022) Critical evaluation of ECOSAR and E-FAST platforms to predict ecological risks of PFAS. *Environ Adv* 8:100221. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100221>
324. Anand SS, Mehendale HM (2005) Computational Toxicology. In: Wexler P (ed) *Encyclopedia of Toxicology* (Second Edition). Elsevier, New York, pp 656–660
325. Sinnaeve BA, Decaestecker TN, Risha PG, et al (2005) Liquid chromatographic–mass spectrometric assay for simultaneous pyrimethamine and sulfadoxine determination in human plasma samples. *J Chromatogr A* 1076:97–102. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.04.047>
326. Bergqvist Y, Eckerbom S, Larsson H, Malekzadeh M (1991) Reversed-phase liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the antimalarial drugs

- sulfadoxine, pyrimethamine, mefloquine and its major carboxylic metabolite in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 571:169–177. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(91\)80443-G](https://doi.org/10.1016/0378-4347(91)80443-G)
327. Bergqvist Y, Eriksson M (1985) Simultaneous determination of pyrimethamine and sulphadoxine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79:297–301. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(85\)90365-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(85)90365-7)
 328. Midskov C (1984) High-performance liquid chromatographic assay of pyrimethamine, sulfadoxine and its N4-acetyl metabolite in serum and urine after ingestion of suldox. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 308:217–227. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(84\)80211-X](https://doi.org/10.1016/0378-4347(84)80211-X)
 329. Edstein M (1984) Quantification of antimalarial drugs: I. Simultaneous measurement of sulphadoxine, N4-acetylsulphadoxine and pyrimethamine in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 305:502–507. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)83369-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)83369-1)
 330. Astier H, Renard C, Cheminel V, et al (1997) Simultaneous determination of pyrimethamine and sulphadoxine in human plasma by high-performance liquid chromatography after automated liquid-solid extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 698:217–223. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00264-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00264-8)
 331. Green MD, Mount DL, Nettey H (2002) High-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of sulfadoxine and pyrimethamine from whole blood dried onto filter paper. *J Chromatogr B* 767:159–162. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00547-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00547-3)
 332. Mwalwisi YH, Hoellein L, Kaale E, Holzgrabe U (2016) Development of a simple, rapid, and robust liquid chromatographic method for the simultaneous determination of sulfalene, sulfadoxine, and pyrimethamine in tablets. *J Pharm Biomed Anal* 129:558–570. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.044>
 333. Peris-García E, García-Alvarez-Coque MC, Carda-Broch S, Ruiz-Angel MJ (2019) Effect of buffer nature and concentration on the chromatographic performance of basic compounds in the absence and presence of 1-hexyl-3-methylimidazolium chloride. *J Chromatogr A* 1602:397–408. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.06.061>
 334. Schellinger A, Carr P (2004) Solubility of Buffers in Aqueous–Organic Effluents for Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Lc Gc N Am* 22:544–+
 335. García-Casal MN, Layrisse M (2001) The effect of change in pH on the solubility of iron bis-glycinate chelate and other iron compounds. *Arch Latinoam Nutr* 51:35–36
 336. Singh P, Kumar S (2019) Chapter 2 - Microbial Enzyme in Food Biotechnology. In: Kuddus M (ed) *Enzymes in Food Biotechnology*. Academic Press, pp 19–28
 337. George P (1947) Reaction Between Catalase and Hydrogen Peroxide. *Nature* 160:41–43. <https://doi.org/10.1038/160041a0>
 338. European Parliament and the Council of the European Union (2008) Regulation No 1272/2008/EC. Official Journal of the European Union