

II 40.269



Universitatea Dunărea de Jos Galați
Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor

Contribuții la evaluarea riscului de contaminare a alimentelor și apei cu reziduuri ale produselor farmaceutice

Rezumatul tezei de doctorat

Ing. Carmen Lidia Tudose (Chițescu)

**Coordonator Științific
Prof. dr. ing. Auca Nicolau**

Galați 2012

2015
15

Rezumat

Această teză de doctorat vizează trei probleme importante pentru siguranța alimentară: prezența reziduurilor farmaceutice în alimente și mediul înconjurător, transferul acestor contaminanți din mediul înconjurător în lanțul alimentar și impactul asupra consumatorilor.

Pentru detecția reziduurilor de compuși farmaceutici în diferite matrici au fost dezvoltate metode analitice noi.

O metodă HPLC a fost dezvoltată pentru analiza simultană a patru sulfonamide în țesut muscular de pui. Aplicată pe probe de carne prelevate de pe piața din România, metoda a pus în evidență prezența contaminării cu sulfadiazină în 12 dintre cele 30 de probe examinate.

O metodă U-HPLC cuplată cu tehnica de înaltă rezoluție Orbitrap MS a fost dezvoltată pentru screeningul print-un singur proces de detecție MS a 43 de compuși farmaceutici și antifungici în apă, în domeniul de concentrații de la 10 la 100 ng L⁻¹. Studiul a confirmat prezența reziduurilor în probe de apă din România și Olanda.

Aceeași metodă analitică a fost aplicată pe probe de sol și plante pentru aceleași clase de compuși, în domeniul de concentrații de la 10 la 100 μg kg⁻¹. Pentru extracția compușilor din matricile complexe s-au comparat două tehnici: extracția asistată de ultrasunete și extracția accelerată cu solvenți (ASE). Purificarea și concentrarea probelor s-a realizat utilizând extracția în fază solidă (SPE). Metoda a fost folosită pentru analiza a diferite probe de sol colectate din zone agricole din Olanda, fiind confirmată contaminarea cu oxitetreciclină.

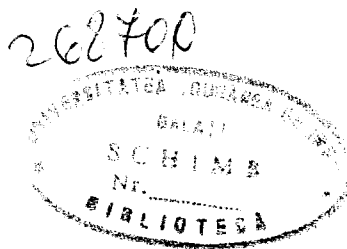
Metoda analitică a fost folosită pentru a investiga potențialul plantelor de a prelua din sol trei compuși farmaceutici diferiți. Studiul a concluzionat că plantele utilizate în experiment (tarbă și cresson) au fost capabile să preia antibiotice, subliniind totodată legătura dintre proprietățile fizico-chimice ale compușilor selectați și absorbția acestora de către plante.

În final, expunerea omului la transferul în lanțul alimentar a compușilor farmaceutici prezenți în sol a fost evaluată pe baza unui model matematic.

Aceasta teză a fost susținută de Proiectul SOP HRD – EFICIENT 61445.

Mulumesc, deasemenea, Institutului RIKILT – Laborator de Referință European pentru Controlul Reziduurilor din cadrul Universității Wageningen, Olanda, pentru toate facilitățile puse la dispoziție în realizarea experimentelor cuprinse în această teză.

Mulumesc Institutului Național Pasteur - Laboratorul de Gnotobiologie și Testări experimentale și Departamentului de Cercetare, Dezvoltare, Diagnostic și Controlul Calității pentru sprijinul acordat în realizarea unor experimente cuprinse în această teză.



Cuprins

(numerotarea paginilor este cea corespunzătoare tezei de doctorat)

Introducere	26
Capitolul 1. Reziduuri ale produselor farmaceutice prezente în alimente și apă și riscurile asociate lor	30
1.1. Introducere	31
1.2. Identificarea claselor de compuși farmaceutici care prezintă risc de contaminare a produselor alimentare	32
1.2.1. Antibiotice	32
1.2.2. Antihelmintice	40
1.2.3. Coccidiostatice	41
1.2.4. Tranchilizante	41
1.2.5. Hormoni	42
1.2.6. Substanțele antiinflamatoare	42
1.3. Contaminarea mediului cu produse farmaceutice. Căi de expunere a omului la reziduurile compușilor farmaceutici	45
1.4. Legislația cu privire la controlul reziduurilor farmaceutice în EU	47
1.4.1. Legislația privind produsele alimentare de origine animal	47
1.4.2. Legislația privind protecția mediului	49
1.4.3. Criteriile de performanță pentru metodele analitice folosite pentru analiza reziduurilor	50
1.5. Concluzii	53
Capitolul 2. Analiza simultană a patru sulfonamide în țesut muscular de pui prin HPLC	54
2.1. Introducere	55
2.2. Materiale și metode	57

2.3.	Validarea metodei analitice	60
2.4.	Rezultate și discuții	60
2.4.1.	Prepararea probei	60
2.4.2.	Calibrare externă cu soluții standard	61
2.4.3.	Specificitatea	62
2.4.4.	Repetabilitatea	63
2.4.5.	Exactitatea	64
2.4.6.	Linearitatea	64
2.4.7.	Limitele de detecție (LD) și de cuantificare (LQ)	65
2.4.8.	Limita de decizie (CC α) și capacitatea de detecție (CC β)	65
2.5.	Confirmarea LC – MS/MS	66
2.6.	Analiza probelor reale	69
2.7.	Concluzii	70
Capitolul 3.	Extracția asistată de ultrasunete în comparație cu extracția accelerată cu solvenți (ASE) urmată de analiza UHPLC-Orbitrap-MS pentru screeningul compușilor farmaceutici și al fungicidelor în probe de sol și material vegetal	71
3.1.	Introducere	73
3.2.	Materiale și metode	75
3.3.	Rezultate și discuții	83
3.3.1.	Optimizarea extracției	83
3.3.2.	Compararea extracției ASE cu extracția asistată de ultrasunete	89
3.3.3.	Procedura de purificare și concentrare în fază solidă	9
3.3.4.	Separarea cromatografică	91
3.3.5.	Analiza MS	91

3.4.	Validarea metodei și analiza probelor	94
3.5.	Confirmarea LC-MS/MS	94
3.6.	Concluzii	98
Capitolul 4. O nouă metodă pentru screeningul compușilor farmaceutici și antifungici în apă utilizând tehnica U-HPLC – Exactive Orbitrap MS		100
4.1.	Introducere	102
4.2.	Materiale și metode	107
4.3.	Rezultate și discuții	112
4.3.1.	Optimizarea extracției în fază solidă	112
4.3.2.	Analiza MS	117
4.4.	Validarea metodei și analiza probelor	122
4.5.	Confirmarea LC-MS/MS	125
4.6.	Problematica rezultatelor fals pozitive și fals negative pentru metodele de screening	130
4.7.	Rezultatele screeningului pentru probelor colectate din râuri din România	135
4.8.	Concluzii	139
Capitolul 5. Absorbția compușilor farmaceutici din sol de către plante		141
5.1.	Introducere	142
5.2.	Partea experimentală	145
5.2.1.	Descrierea solului folosit în experiment	145
5.2.2.	Descrierea plantelor folosite în experiment	145
5.2.3.	Descrierea compușilor farmaceutici utilizați în experiment	145
5.2.4.	Studiul de absorbție	146
5.2.5.	Analiza materialului vegetal.	149
5.3.	Estimarea concentrației absorbite	151

5.4.	Rezultate și discuții	152
5.5.	Concluzii	157
Capitolul 6. Evaluarea contaminării pe lanțul animal-sol-plante-animat		159
6.1.	Introducere	160
6.2.	Parametrii scenariului	161
6.3.	Descrierea contaminanților	163
6.4.	Descrierea modelului	166
6.4.1.	Estimarea cantității de contaminant în sol	166
6.4.2.	Estimarea absorbției contaminanților de către plante	171
6.4.3.	Estimarea transferului contaminanților de la plante la produse alimentare	171
6.5.	Analiza sensibilității modelului	175
6.6.	Concluzii	179
Capitolul 7. Caracterizarea riscului alimentar de ingestie a alimentelor și apei contaminate cu reziduuri ale compușilor farmaceutici.		180
7.1.	Introducere	181
7.2.	Substanțe farmaceutice în apa potabilă	182
7.3.	Doza zilnică estimată	183
Concluzii		184
Contribuții originale și direcții viitoare de cercetare		187
Concretizarea rezultatelor obținute		190
Referințe		192

Introducere

În agricultura modernă, medicamentele de uz veterinar sunt utilizate pe scara largă și administrate animalelor în diferite moduri: ca aditivi în hrană, în apă de băut sau alte forme, în scopuri terapeutice, profilactice sau ca promotori de creștere. Consumul anual de medicamente veterinare în Europa este estimat la peste 10 000 tone (Stolker, 2005). Mai mult de 70% din acestea sunt antibiotice (Halling-Sorensen et al., 1998).

Reziduurile acestor substanțe pot apărea în alimentele de origine animală. Utilizarea în scop terapeutic nu ar trebui să pună probleme în acest sens dacă tratamentul se face sub îndrumarea unui medic veterinar, însă, dacă aceste substanțe se administrează în mod necontrolat, în doze mari, iar animalele se sacrifică la scurt timp după administrarea tratamentului, reziduurile pot apărea în alimente, uneori în cantități ce depășesc limitele maxime admise.

Conduita profilactică este o componentă importantă a managementului unei ferme în care un număr mare de animale trăiesc împreună, într-un spațiu relativ restrâns. Pentru a preveni îmbolnăvirile în masă se folosește aditivarea hranei cu doze subterapeutice de medicamente. Hrana medicamentată prin adaos de antibiotice se folosește și ca promotor de creștere în multe țări din Europa. Aceste aspecte fac ca apariția reziduurilor să fie un motiv de îngrijorare pentru siguranța alimentară.

Totodată, studii recente au raportat detectarea compușilor farmaceutici în apa de suprafață, freatică sau potabilă, în sol sau plante, ceea ce denotă potențialul de contaminare al mediului cu aceste substanțe, în urma a diferite practici agricole sau a deversării necontrolate a deșeurilor (Batt și Aga, 2005).

Mai multe Regulamente și Decizii ale comisiilor Parlamentului European, sau Ghiduri ale Agenției Europene pentru Medicamente și Agenției Europene de Mediu, reglementează nivelul maxim de reziduuri admis, interzic folosirea anumitor substanțe, impun analize de risc pentru mediu în vederea obținerii autorizațiilor de fabricație sau comercializare, stabilind totodată

programele de prelevare și control al reziduurilor în produsele alimentare precum și performanțele metodelor analitice folosite.

Existența metodelor pentru determinarea reziduurilor farmaceutice este esențială în evaluarea riscului sau în procesele de decizie.

Mulți din acești compuși sunt prezenți în concentrații foarte mici, iar distribuția lor în spațiu și timp este atât de variată astfel încât dezvoltarea de metode precise de determinare reprezintă o provocare pentru etapa de analiza a riscului.

Programele actuale de monitorizare necesită metode sensibile și selective pentru analiza acestor contaminanți. Odată cu dezvoltarea tehnicilor de detecție trebuie dezvoltate și metode potrivite pentru prepararea diverselor probe.

Principalul scop al acestei teze a fost acela de a contribui la cercetarea curentă în domeniu, prin dezvoltarea de noi metode pentru analiza reziduurilor farmaceutice în alimente, apă, sol și de a evalua căile de expunere a omului la aceste reziduuri.

Teza are două părți principale, prima axată pe dezvoltarea și validarea unor metode analitice noi, utilizând cromatografia în lichide și spectrometria de masă, incluzând tehnici specifice de prepararea a probelor din matrici complexe (țesut animal, apă, sol, material vegetal).

Au fost dezvoltate metode de screening, folosind tehnici diferite: HPLC-UV, U-HPLC- Orbitrap MS. Criteriile stricte de identificare a compușilor determinați prin metodele de screening au impus folosirea spectrometriei de masă MS/MS pentru confirmarea rezultatelor. Diverse tehnici de extracție ca: extracția lichid-lichid, extracția în fază solidă SPE, extracția accelerată cu solvenți (ASE) și extracția asistată de ultrasunete au fost aplicate și comparate.

A doua parte a tezei se constituie în evaluarea absorbției a trei compuși farmaceutici diferiți de către plante din sol contaminat și elaborarea unui model matematic pentru evaluarea contaminării cu compuși farmaceutici de-a lungul lanțului alimentar animal – sol – plante – animal – om.

Lucrarea este structurată în 9 capitole după cum urmează:

Capitolul I cuprinde informații din literatură privitoare la identificarea potențialilor contaminanți farmaceutici și a efectelor posibile ale acestei contaminări, evidențiază căile de contaminare, subliniind totodată aspecte ale legislației din acest domeniu.

Capitolul II descrie dezvoltarea unei metode simple pentru determinarea simultană a patru sulfonamide (sulfadimetoxina, sulfadiazina, sulfametoxazol și sulfaquinoxalina) în țesutul muscular de pui, prin analiză HPLC cu detecție UV. Pentru extracția compușilor de interes din

probă s-a utilizat tehnica de extracție lichid – lichid cu solvenți organici. Metoda a fost validată în conformitate cu legislația Europeană (Decizia 657/2002 CE). Limitele de detecție (LOD) au variat între 6.5 și 0.14 $\mu\text{g kg}^{-1}$, regăsirea pentru probele îmbogățite cu 50, 100, 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ amestec sulfonamide a fost peste 70%. Metoda validată a fost aplicată într-un studiu de depleție a reziduurilor și pe probe reale colectate din piețe din România. Rezultatele au arătat contaminarea a 12 probe de mușchi din cele 30 colectate cu sulfadiazină în concentrații care variază de la 180 $\mu\text{g kg}^{-1}$ la 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Aceasta concentrație depășește limita de toleranță reglementată. Rezultatele au fost confirmate prin analiză HPLC-MS/MS.

Capitolul III descrie dezvoltarea unei metode de screening pentru determinarea simultană a 42 compuși farmaceutici, biocide și fungicide în sol și în probe de material vegetal. Pentru extracția compușilor de interes au fost comparate extracția asistată de ultrasunete și extracția accelerată cu solvenți (ASE). Ca tehnică de analiză s-a utilizat separarea compușilor prin cromatografie de Ultra-Performanță (UPLC) urmată de analiza spectrometrică de masă de înaltă rezoluție folosind tehnologia Orbitrap MS. Analiza compușilor s-a realizat printr-un singur proces de detecție MS, într-o abordare post-target.

Ambele procese de extracție au fost optimizate și comparate. Un proces de extracție ASE a fost validat pentru determinarea a 42 de compuși farmaceutici, biocide și fungicide diferite, în sol și în plante. Eficiența recuperării din probele de sol a fost mai mare de 70% pentru mai mult de 68% din compuși. Limita de detecție a fost $\leq 10 \text{ mg kg}^{-1}$ pentru 93% din compușii testați. Eficiența recuperării din probele de material vegetal a fost peste 70% pentru 64% din compușii testați. Limita de detecție a fost $\leq 10 \text{ mg kg}^{-1}$ pentru 66% din compuși. Metoda a fost folosită la analiza de probe de sol și material vegetal colectate din zone agricole din Olanda. În urma analizelor au fost detectate reziduuri de oxitetracilină.

Capitolul mai cuprinde aspecte practice și teoretice ale optimizării preparării probei, considerații referitoare la procedura de validare, și evidențiază avantajele folosirii unui echipament de înaltă rezoluție pentru detecția MS.

Capitolul IV descrie dezvoltarea și validarea unei metode rapide și selective pentru screeningul a 43 de compuși farmaceutici și antifungici, în apa de suprafață și freatică, printr-un singur proces de detecție MS, utilizând tehnica U-HPLC-MS Exactive Orbitrap la o rezoluție de 50,000. Detecția compușilor s-a bazat pe masa exactă calculată și pe timpul de retenție. S-au evidențiat importanța preciziei și a puterii de rezoluție pentru acuratețea rezultatelor. Au fost optimizate

condițiile purificării probelor prin extracție în fază solidă (SPE) pentru o recuperare cât mai bună a analiților.

Prin aplicarea metodei finale, 74% din compuși au prezentat recuperări mai mari de 80%, 15% din compuși au prezentat recuperări între 60% și 80% și 7% din compuși au prezentat recuperări între 40% și 50%. Nivelul de detecție a fost de 10 ng L^{-1} pentru 61% dintre compuși, 50 ng L^{-1} pentru 32% și 100 ng L^{-1} pentru 5% dintre compuși. Probe reale colectate din Olanda și România, au fost analizate prin metoda specificată, evidențiindu-se prezența a diferiți contaminați farmaceutici. Toate rezultatele au fost confirmate prin detecție MS/MS.

Totodată, pentru evitarea rezultatelor fals positive și negative, situație comună metodelor de screening utilizate în prezent, a fost propusă optimizarea metodei de screening prin fragmentarea ionilor, detecția în full-scan printr-un singur process MS și identificarea de fragmente caracteristice, folosind același echipament, Exactive Orbitrap - MS.

Capitolul V investighează potențialul a două specii de plante de a absorbi trei compuși farmaceutici printr-un studiu experimental. Au fost folosite două tipuri de sol și două tipuri de plante: iarbă și cresson (o plantă pentru consum uman ce intră în componența unor salate). Contaminarea solului s-a realizat la două niveluri de concentrație: 5 mg kg^{-1} and 10 mg kg^{-1} . Analiza datelor obținute a concluzionat că plantele utilizate în acest studiu sunt capabile să absoarbă sulfamethoxazol și ketoconazol când solul este contaminat la un nivel de $5\text{-}10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Este explicată și subliniată legătura dintre procesele de absorție și proprietățile fizico-chimice ale substanțelor sau calitatea solului, concentrațiile experimentale fiind comparate cu cele obținute în urma aplicării unui model matematic.

Capitolul VI evaluează prin modelare matematică transferul de produse farmaceutice de-a lungul lanțului alimentar animal – sol – plantă – animal – om. S-au analizat nouă scenarii ținând cont de emisia contaminanților, depozitarea și aplicarea gunoierului de grajd, capacitatea plantelor de a absorbi substanțele din sol și de bioacumularea acestora în organismul animal. Valorile obținute pentru carne au variat între $0 - 2 \text{ ng kg}^{-1}$ pentru oxitetraciclină, $0,824 - 0,11 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ pentru sulfametoxazol și $32,4 - 0,05 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ pentru ketoconazol.

În urma analizei sensibilității aplicată modelului propus, s-a stabilit că parametrii cheie ai acestuia sunt coeficientul de partiție octanol – apă al substanțelor și fracția de materii organice conținută de sol.

Capitolul VII evaluează datele obținute în capitolul anterior din punctul de vedere al expunerii consumatorului la acești contaminanți, luând în considerare reziduurile din alimente de origine animală, din apă și din vegetale.

Ultimele capitole ale tezei se referă la concluziile acestui studiu și propun noi direcții de cercetare.

Rezultate experimentale

Capitolul 2

Analiza simultană a patru sulfonamide în țesut muscular de pui prin HPLC

2.1. Introducere

Sulfadimethoxina, sulfametoxazolul, sulfaquinoxalina și sulfadiazina sunt sulfonamidele cele mai frecvent utilizate în crescătoriile de păsări. Ele sunt absorbite cu ușurință și distribuite în organismului păsărilor, se acumulează în diferite țesuturi și se transferă în produsele alimentare obținute prin prelucrarea cărnii (Kan și Petz, 2000; Furusawa și Kishda 2002). Nerespectarea perioadelor de așteptare recomandate înainte de sacrificare, poate afecta siguranța alimentară cu privire la carnea de pui și produsele obținute din aceasta.

Scopul acestui studiu este de a promova o metodă HPLC-UV, care poate fi utilizată pentru detecția și cuantificarea reziduurilor sulfonamidelor în carnea de pui. Această metodă ar putea fi utilă atât laboratoarelor din fabricile de medicamente de uz veterinar pentru stabilirea timpului de așteptare, precum și laboratoarelor oficiale de control, care evaluează în mod regulat punerea în aplicare a bunelor practici veterinare, pentru a detecta abaterile de la regulile de utilizare a medicamentelor de uz veterinar.

Sulfonamidele determinate au fost: sulfametoxazol sulfadimethoxina, sulfaquinoxalina și sulfadiazina, unele dintre cele mai utilizate sulfonamide în practica veterinară curentă. Validarea metodei s-a realizat în conformitate cu ghidurile în vigoare privind validarea metodelor analitice pentru determinarea reziduurilor de produse farmaceutice de uz veterinar în produse alimentare

de origine animală. Metoda este exactă, selectivă, simplă, economică ca timp și costuri, capabilă să detecteze reziduuri de sulfonamide sub limitele maxime de reziduuri (MRL).

2.2. Materiale și metode

Aparatura

Analizele s-au efectuat cu ajutorul unui sistem HPLC cu detector UV (Waters 96, USA), prevăzut cu auto- sampler (Waters 717 Plus, USA) și pompă quaternară (Waters 510 și 590, USA). Coloana cromatografică pe care s-a realizat separarea compușilor: Zorbax SB-C18 (Agilent Technologies, USA).

Standardele au fost procurate de la: Sigma Chemical (USA) pentru sulfadimetoxină, și sulfametozazol și EDQM (Strasbourg, Franța) pentru sulfaquinoxalină, și sulfadiazină.

S-au utilizat reactivi de puritate cromatografică.

Colectarea probelor

Matricele blane au provenit de la pui care nu au primit anterior vreun tratament medicamentos, proveniți de la Biobaza S.N. Institutul Pasteur. Probele au fost depozitate în stare congelată la -17°C , până la utilizare.

Studiul de depleție a reziduurilor s-a efectuat pe pui cărora li s-au administrat doze terapeutice de medicamente, în condiții normale de ferma. Păsările au fost furnizate de către S.N. Biobaza Institutul Pasteur, București, România - Laboratorul pentru teste experimentale pentru pui de găină și curcani.

30 probe de carne de pasăre a câte 100 g, au fost colectate din diverse piețe din România, regiunea Prahova și Galați. Probele de țesut muscular au fost depozitate în stare congelată (-17°C), până la efectuarea analizelor.

Prepararea probelor

Extracția sulfonamidelor s-a realizat utilizând o metodă modificată după Furusawa și Hanabusa, Stoev și Michailova (2000). Zece grame de probă omogenizată se cântăresc într-un tub de centrifugă și se adaugă 20 mL acetonitril. Proba se omogenizează prin agitare timp de 3 min și se centrifughează la 3500 rpm timp de 10 min. Supernatantul se colectează iar reziduul se extrage din nou cu 10 mL de acetonă. După omogenizare și agitare timp de 3 minute, proba se centrifughează din nou. Extractele reunite se evaporă aproape de sec la 30°C . Reziduul se reia cu

5 mL de diclormetan și se extrage. Se centrifugează la 3500 rpm, 10 min. Se separă diclormetanul și se repetă extracțiile de încă două ori, reunind extractele de diclormetan. Se evaporă extractele reunite la sec la 40°C. Reziduul se reconstitue în 1mL de metanol: fosfat disodic soluție 6 g L⁻¹ (50:50). Se adaugă 2 mL hexan pentru îndepărtarea pigmentilor și grăsimilor, se agită, se centrifugează la 3500 rpm timp de 15 min și se îndepărtează hexanul. Soluția rămasă se filtrează printr-un filtru de 0,2 - 0,45μm și se injectează în sistemul HPLC.

Analiza HPLC: Fază mobilă: 75 : 25 = soluție fosfat disodic 6 g L⁻¹ (pH = 8.5) : metanol (v/v). Debitul fazei mobile: 1 mL min⁻¹. Volumul de injecție: 20 μL. Lungime de undă detector: 254 nm. Durata analizei: 10 min.

Confirmarea LC-MS/MS

Identificarea și cuantificarea analiților a fost realizată cu ajutorul unui sistem LC Waters 2695 (USA) HPLC, cuplat cu un spectrometru de masă quadropolar MS–MS Quattro Micro (Micromass, USA). Coloana de separare folosită: X Bridge Shield RP18 (Waters, USA). Faza mobilă: metanol (B) și 0.1% soluție de acid formic (A).

Pentru confirmare au fost aplicate criteriile descrise de Deciziei 2002/657/CE, incluzând detectarea a două fragmente ionice cu un raport corespunzător.

2.3. Validarea procedurii analitice

Metoda propusă a fost validată în conformitate cu prevederile Ghidului EMEA - " Notice to applicant and Guideline – veterinary medicinal products, Vol 8" și ale Deciziei Comisiei EEC 657/2002, urmărind următoarele criterii: specificitate, precizie, acuratețe, linearitate, limita de cuantificare, limita de detecție.

Parametrii validării sunt detaliați în tabelul 2.1.

Tabelul 2.1. Parametrii de validare ai metodei HPLC

Reziduu marker	RT min	LOD μg kg ⁻¹	LOQ μg kg ⁻¹	Media RSD %	Media regăsirii %	CCα μg kg ⁻¹	CCβ μg kg ⁻¹	Linearitate
Sulfadiazina	2.7	0.14	0.42	11	84	104	108	0.9958
Sulfadimetoxina	3.2	0.36	1.08	13	77	109	121	0.9834
Sulfametoxazol	4.0	0.58	1.68	9	70	111	119	0.9913
Sulfaquinoxalina	6.8	6.53	19.6	8	71	113	125	0.9800

2.4. Rezultate și discuții

2.4.1. Prepararea probei

La fel ca pentru cele mai multe antibiotice, extragerea selectivă a sulfonamidelor din țesuturile biologice este complicată din cauza caracterului polar al analiților și a componentelor matricei deopotrivă (Stolker, 2005).

Sulfonamidele au o bună solubilitate în solvenți polari. Acetonitrilul a fost ales pentru a extrage aceste compuși și datorită proprietăților de a denatura și precipita proteinele probei, ceea ce determină o extracție "curată" și eficientă prin eliberarea reziduurilor de sulfonamide legate de aceste proteine. Acetona a fost de asemenea folosită pentru epuizarea compușilor de interes din probă.

Polaritatea diclormetanului este mai mică decât a acetonitrilului și acetonei, permițând separarea compușilor de interes din extractul inițial. N-hexanul a fost utilizat pentru degresarea extractului. Pe parcursul extracției a fost observat ca fiind important să se respecte proporția dintre solvenți. Prin prelucrarea rezultatelor obținute rezultă că specificitatea și coeficientii de recuperare au fost în limite acceptabile, ceea ce confirmă eficiența extracției și o bună înlăturare a interferențelor matricei. Limita de detecție a fost, de asemenea, comparabilă cu alte metode raportate.

2.6. Analiza probelor reale

Rezultatul analizelor HPLC a experimentului de depleție a arătat toate țesuturile animale conțin sulfonamide peste nivelul MRL.

Treizeci de probe de mușchi de pui colectate din piețe din România, au fost investigate pentru reziduurile de sulfonamide folosind metoda HPLC prezentată mai sus. Douăsprezece probe de mușchi au conținut sulfadiazină în concentrații care variază de la 180 $\mu\text{g kg}^{-1}$ la 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$, ceea ce depășește limita de toleranță reglementată.

2.7. Concluzii

Metoda prezentată a fost dezvoltată pentru a determina simultan reziduuri de sulfadiazină, sulfametoxazol, sulfadimethoxina și sulfaquinoxalina în mușchiul de pui prin analiza HPLC, după extracția cu solvenți organici.

Metoda este simplă, rapidă și economică. Criteriile de validare impuse: specificitate, precizie, exactitate, limita de detecție și cuantificare, linearitate, au respectat condițiile impuse de Decizia comisiei Europene 2002/657/EC, cu privire la validarea metodelor de analiză. Rezultatele au fost confirmate prin analize MS/MS conform legislației în vigoare.

Metoda poate detecta reziduuri de sulfonamide, fără utilizarea spectrometriei de masă sau derivatizarea fluorimetrică a componentilor.

Metoda propusă este potrivită pentru controlul reziduurilor în țesutul muscular de pui, pentru utilizarea în studii de depleție și determinarea timpului de așteptare pentru oricare din analiții prezentați.

Capitolul 3

Extracția asistată de ultrasunete în comparație cu extracția accelerată cu solvenți (ASE) urmată de analiza U-HPLC-Orbitrap-MS pentru screeningul compușilor farmaceutici și al fungicidelor în probe de sol și material vegetal

3.2. Materiale și metode

Compușii chimici, reactivi și materiale

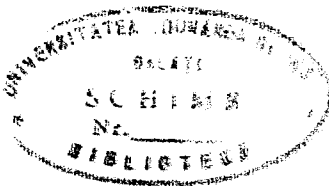
Un amestec de compuși diferiți aparținând unor clase diferite de substanțe farmaceutice cum ar fi: benzimidazoli, tranchilizante, macrolide, sulfonamide, chinolone, peniciline, tetraciline, anti-inflamatoare nesteroidiene (AINS), antiepileptice, regulatori de lipide, antifungice azolice, antifungice poliene, inhibitori mitotici, biocide și fungicide, a fost ales pentru a dezvolta această metodă.

Toate substanțele standard utilizate au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich Chemie BV, cu excepția natamicinei, achiziționată de la Fluka, carazololul, bromuconazol și acid clofibric, de la Dr. Ehrenstorfer și itraconazolul, terconazolul, ketoconazolul și fluconazolul, care au fost achiziționate de la EDQM. S-au utilizat reactivi de puritate cromatografică.

Colectarea probelor

Probele selectate au fost matrici reale de mediu incluzând probe de soluri diferite (nisipoase și argiloase), culturi și iarbă, din zone agricole importante din Olanda. Probele au fost prelevate în luna mai 2011, după perioada de fertilizare a solurilor, care, în Olanda începe în luna martie. Din fiecare punct de prelevare, cuprinzând o suprafață de 1 m², au fost prelevate câte două sub-probe.

268700



Probele de sol au fost uscate într-un cuptor Memmert (Depex) la 40 °C, timp de 6 ore, trecute printr-o sită de 2 mm apoi, sub-probele din fiecare punct de prelevare au fost omogenizate. Probele s-au depozitat la 4 °C în frigider până când au fost extrase și analizate, dar nu mai mult de 30 de zile.

Materialul vegetal proaspăt a fost tocat în blender, omogenizat și depozitat la -20 °C până la extracție, dar nu mai mult de 30 zile.

Procedura de extracție ASE

Extracția a fost efectuată cu ajutorul unui sistem de ASE 200 echipat cu un selector de solvenți (Dionex, ASE 350, SUA). Aproximativ 5 g de probă de sol uscat sau 3 g de material vegetal proaspăt, tocat în prealabil, s-au amestecat cu 5 g pământ de diatomee pentru a crește suprafața de contact între probă și solventul de extracție și pentru a preveni colmatarea celulei de extracție. Celulele de extracție cu capacitatea de 33 mL (câptușite cu filtre din microfibră Whatman) au fost umplute cu probele astfel pregătite.

Condițiile optime de funcționare pentru procedura ASE au fost: temperatura de extracție 50°C; presiunea de extracție 1500 psi; două cicluri statice de extracție cu durata de 5 min fiecare, volum de spălare 50%. Au fost utilizați următorii solvenți de extracție: acetonă: acid citric 0,2 M - 50:50 (pH-ul ajustat la 4,5 cu hidroxid de sodiu), pentru probele de sol și metanol: acid citric 0,2 M - 50:50 (pH-ul ajustat la 4,5 cu hidroxid de sodiu), pentru probele de material vegetal.

După extracție, în fiecare probă s-au adăugat câte 100 μ L Na₂EDTA 1M și apă ultrapurificată până la un volum de 50 mL. Probele au fost centrifugate timp de 15 min la 3500 rot / min (Centrifuga BVM 6 / 300). O parte alicotă din extract, corespunzătoare la 1 g de probă a fost separată și diluată cu apă până la o concentrație finală de solvent organic de 10%.

Procedura de extracție asistată de ultrasunete

5 g de sol sau 3 g de material vegetal au fost cântărite cu precizie în tuburi de centrifugare de 50 ml. În fiecare tub au fost adăugați câte 100 μ L Na₂EDTA 1M. Analizii au fost extrași în 20 mL solvent de extracție prin plasarea tuburilor într-o baie cu ultrasunete, timp de 1 h, urmată de agitare, 1 h. Solventul de extracție utilizat a fost metanol: acid citric 0,2 M - 50:50 (pH-ul ajustat la 4,5 cu hidroxid de sodiu). După extracție, probele au fost centrifugate timp de 15 min la 3500 rpm.; supernatantul a fost transferat într-un balon de 50 mL. Procedura de extracție a fost repetată o dată, cu același volum de solvent. Extractele au fost combinate, omogenizate, adăugându-se apă ultra pură până la volumul de 40 mL. O parte alicotă din extract

corespunzătoare la 1 g de probă a fost separată și diluată cu apă până la o concentrație finală de solvent organic de 10%.

Procedura de extracție în fază solidă (SPE)

Purificarea și concentrarea probelor s-a realizat printr-o procedură de extracție în fază solidă. Descrierea procedurii optimizate se face la capitolul 4.

Instrumentație

Pentru analize a fost folosit un sistem LC-MS de seanare completă: Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific), cuplat cu un cromatograf de lichide de ultra presiune (U-HPLC) (Thermo Scientific Accela TM). Rezoluția sistemului MS: 50.000 FWHM.

Rezoluția cromatografică superioară a fost asigurată de un cromatograf de lichide de ultraperformanță. Coloana de cromatografie folosită: UPLCH Acquity C18 (100 x 2,1 mm, 1,8 μm) (Waters). Faza mobilă a constat în: eluent A, 100% apă care conține 2 mm formiat de amoniu și 160 μL de acid formic; eluent B, metanol 100% ce conține 2mm formiat de de amoniu și 160 μL de acid formic (pH 3.5).

Detecția s-a bazat pe masa exactă calculată și pe timpul de retenție a compușilor țintă (tabelul 3.1.). Datele au fost evaluate cu ajutorul softurilor Quan Browser Xcalibur 0606 (Thermo Fisher) și ToxID Thermo (Thermo Fisher).

Confirmarea LC-MS/MS

Pentru analiza confirmatorie (obținerea a acel puțin 3 puncte de identificare) s-a folosit un sistem triplu quadrupolar MS / MS (Micromass Ultima Quattro, Waters), echipat cu o interfață electrospray, cuplat cu un sistem HPLC (LC-20AD Shimadzu). Pentru separarea cromatografică s-a folosit o coloană Simetria C18 (150 x 3 mm, 5 microni) (Waters).

3.3. Rezultate și discuții

3.3.2. Compararea extracției ASE cu extracția asistată de ultrasunete

Ambele metodologii de extracție au fost comparate, în ceea ce privește recuperarea relativă, nivelul de detecție, și selectivitatea, îmbogățind probe maror la concentrația de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ și $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Procedurile utilizate au fost optimizate. ASE prezintă valori mai mari de recuperare decât extracția cu ultrasunete. De asemenea, procedura ASE permite detectarea tuturor compușilor de interes, cei mai mulți dintre ei la un nivel de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

În plus, extracția ASE este mai rapidă și complet automatizată oferind rezultate repetabile, astfel încât ASE a fost selectată ca tehnică de extracție pentru screening-ul compușilor farmaceutici și al fungicidelor în soluri și material vegetal.

Mai mulți solvenți organici în amestecuri de diferite proporții cu acid citric 0,2 M (50:50) au fost testați în diferite condiții de extracție. Rezultatele au arătat ca utilizarea amestecului acetona: acid citric dă randamente mai bune de extracție pentru probele de sol (Figura 3.1.), iar amestecul metanol : acid citric pentru probele de material vegetal.

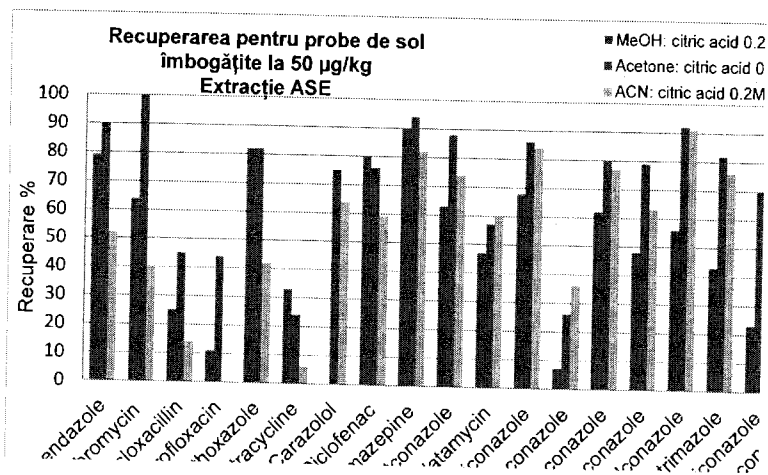


Figura 3.1. Recuperarea din probe de sol pentru 21 dintre compușii analizați, în cazul utilizării a diferiți solvenți organici (ACN, acetona, MeOH) în amestec cu o soluție de acid citric 0,2M, folosind ASE ca tehnică de extracție

Optimizarea metodei de purificare SPE este descrisă în studiul de dezvoltare al metodei de analiză pentru aceleași clase de compuși în apă (Cap. 4).

3.4. Validarea metodei și analiza probelor

Procedura de validare se bazează pe Ghidul de validare a metodelor de screening pentru reziduurile de medicamente veterinare pentru Laboratoarele Comunitare de Referință 20/1/2010. Rezultatele din studiul de validare, inclusiv recuperarea maximă, CC β , media și deviația standard a erorii de masă (Δ ppm), sunt prezentate în Tabelul 3.1.

Tabel 3.1. Rezultatele studiului de validare al metodei: capacitatea de detecție CC β , recuperarea maxima, media și deviația standard a erorii de masă (Δ ppm) pentru probele de sol și material vegetal

Compusul analizat	Probe de sol				Probe de material vegetal			
	CC β μ g/kg	Recuperarea maximă %	Media Δ ppm	St dev Δ ppm	CC β μ g/kg	Recuperarea maximă %	Media Δ ppm	St dev Δ ppm
Flubendazol	50	70	0.70	0.48	50	86	0.62	0.53
Eritromicină	50	90	3.01	3.51	50	85	0.81	0.33
Dicloxacilină	50	45	1.35	0.74	50	60	1.92	1.56
Ciprofloxacină	50	44	0.64	0.49	50	59	1.13	0.64
Sulfamethoxazol	50	82	1.28	0.40	50	60	1.01	1.06
Oxytetracyclin	50	34	0.67	0.64	50	53	0.43	0.58
Carazolol	50	75	1.68	0.39	50	73	0.46	0.48
Diclofenac	50	76	0.94	0.72	50	95	1.26	0.97
Acid meclofenamic	50	99	1.10	0.90	50	95	1.02	1.10
Carbamazepină	50	94	1.28	0.61	50	64	0.92	0.51
Acid clofibrice	50	100	1.11	0.70	50	42	0.97	0.90
Natamicină	50	57	1.52	0.72	50	52	2.03	1.45
Enilconazol	50	92	1.77	0.45	50	86	0.63	0.70
Ketoconazol	50	26	1.52	0.70	50	59	1.67	2.16
Fluconazol	50	35	0.96	0.44	50	65	0.64	0.66
Clotrimazol	50	71	1.03	0.67	50	86	1.89	1.41
Miconazol	50	70	1.84	0.44	50	87	0.85	0.59
Itraconazol	50	11	1.08	0.94	--	--	-	-
Griseofulvin	50	82	1.43	0.50	50	84	0.52	0.39
Voriconazol	50	81	1.23	0.50	50	86	0.71	0.37
Thiabendazol	50	76	1.62	0.33	50	74	0.67	0.33
Difenoconazol	50	79	2.22	0.55	50	100	0.91	0.51
Hexaconazol	50	88	1.82	0.61	50	87	1.01	0.58
Penconazol	50	80	2.13	0.53	50	93	1.12	0.92
Propiconazol	50	88	2.23	0.56	50	70	1.15	1.02

Paclobutrazol	50	69	0.81	0.63	50	80	1.12	0.62
Prochloraz	50	86	1.65	0.62	50	93	1.07	0.49
Tebuconazol	50	87	1.89	0.54	50	78	0.82	0.47
Bromuconazol	50	81	1.82	0.77	50	42	1.69	1.03
Ciproconazol	50	62	1.78	0.85	50	71	1.00	0.36
Epoxiconazol	50	82	1.92	0.45	50	91	0.69	0.82
Fenbuconazol	50	78	1.13	0.52	50	92	1.42	0.66
Fluquinconazol	50	74	0.60	0.35	--	-	-	-
Flusilazol	50	85	1.78	0.49	50	108	0.75	0.74
Flutriafol	50	82	1.04	0.46	50	65	0.51	0.27
Metconazol	50	88	1.16	0.73	50	94	0.55	0.81
Prothioconazol	50	18	1.64	0.64	--	--	-	-
Terconazol	50	51	0.98	0.59	50	84	0.71	0.87
Miclobutanil	50	67	1.24	0.58	50	47	0.32	0.28
Triticonazol	50	87	2.33	0.54	50	85	0.74	0.49
Carbendazim	50	50	1.88	0.32	50	78	0.54	0.33
Metalaxil	50	87	1.12	0.40	50	70	1.02	0.39

3.5. Confirmarea LC-MS / MS

Screeningul probelor de sol a demonstrat contaminarea uneia dintre probe (zona agricolă Harskamp, Olanda). Întrucât analiza confirmatorie necesită cel puțin 3 puncte de identificare, extractul de probă suspect a fost reinjectat într-un sistem triplu cvadrupolar MS/MS. Achiziția datelor a fost făcută prin monitorizarea simultană a mai multor procese de disociere (MRM). Nivelul de contaminare a fost mai mare de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

3.6. Concluzii

Tehnica prezentată oferă o abordare analitică post-target, nu necesită etape diferite de pregătire a probelor specifice diferitelor clase de compuși chiar dacă matricea analizată este complexă și poate fi folosită ca o metodă de screening pentru monitorizarea compușilor selectați în soluri și material vegetal, fiind deja aplicată pe probe reale.

Extracția ASE s-a dovedit a fi superioară tehnicii de extracție cu ultrasunete prin recuperarea mai eficientă a analiților, repetabilitatea rezultatelor, viteză și automatizare.

Oxitetraciclina a fost detectată într-una din probele de sol, indicând că activitatea de fertilizare a solului a determinat contaminarea acestuia.

Mulțumiri

Mulțumesc lui Cornelis van de Kraats – RIKILT, Wageningen, pentru asistența tehnică acordată.

Capitolul 4

O nouă metodă pentru sceningul compușilor farmaceutici și antifunghi în apă utilizând tehnica U-HPLC – Exactive Orbitrap MS

4.2. *Materiale si metode*

Compușii chimici, reactivi și materiale

Pentru compușii sudiați, vezi Tabelul 4.1. Reactivii și materialele folosite sunt cele descrise la Capitolul 3.2. La lista de compuși studiați s-a adăugat nistatina, pentru care s-a achiziționat standardul de la Sigma-Aldrich Chemie B.V. (Zwijndrecht, Olanda).

Prepararea soluțiilor standard

Prepararea soluțiilor standard s-a realizat similar modului de lucru descris la Capitolul 3.2.

Colectarea și pre-tratamentul probelor

Probele au fost selectate pentru a oferi matrice reale de mediu pentru dezvoltarea, validarea și aplicarea metodei. Prelevarea nu a urmat vreun program sau protocol de eșantionare. Probele au fost selectate aleator și includ eșantioane de apă de râu, lacuri, canale, apă de adâncime, din zonele cu activități agricole importante în Olanda (Figura 4.1) sau din râuri din România (Figura 4.2). A fost inclusă și o probă de apă potabilă din România, sursa - Dunăre.

Au fost colectate 15 probe de apă cu volumul individual de 2 L din Olanda și 10 probe cu volum individual de 0,5 L din România.

Pentru a asigura integritatea probelor și pentru a evita contaminarea, au fost utilizate sticle curate de laborator. Probele de apă au fost filtrate printr-o hârtie de filtru (Whatman) și depozitate la 4 °C în frigider până la extracție și analiză, dar nu mai mult de 10 zile.

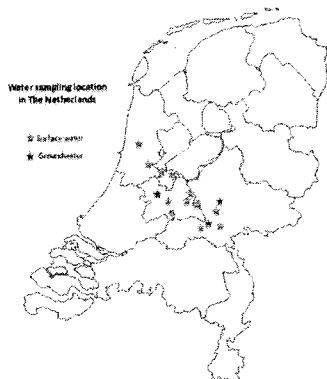


Figura 4.1. Localizarea zonelor de colectare a probelor de apă în Olanda

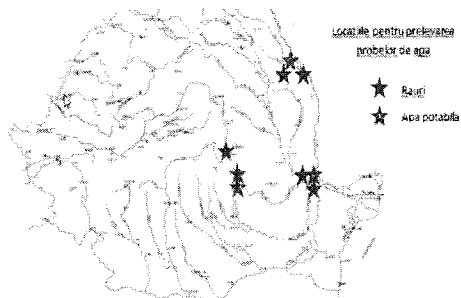


Figura 4.2. Localizarea zonelor de colectare a probelor de apă în România

Extracția, purificarea și concentrarea probelor

La un volum de probă de 100 de mL de apă s-au adăgat 10 μ L soluție de Na_2EDTA 0,5 M . pH-ul a fost ajustat la 3 cu acid acetic 100%. Cartușele de extracție în fază solidă StrataX au fost anterior precondiționate cu 6 mL metanol, urmați de 6 mL de apă. După aplicarea probei, cartușele s-au spălat cu 6 mL apă, urmați de 6 mL amestec metanol / apă 30% (v) și uscare în vid pentru 2 - 3 minute. Eluarea analitilor s-a realizat cu 6 mL metanol. Eluatul a fost concentrat prin evaporare sub flux de azot de înaltă puritate, într-o baie de apă la 42°C (Turbo VAP Evaporator), și redizolvat în 25 μ L metanol și 225 μ L de apă ultrapurificată.

Instrumentație

Pentru analize s-a fost folosit un sistem MS de scanare completă: Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific), cuplat la un cromatograf de lichide de ultra presiune (U-HPLC) (Thermo Scientific Accela TM). Rezoluția sistemului MS: 50.000 FWHM. Coloana de cromatografie folosită: U-HPLC Acquity C18 (100 x 2,1 mm, 1,8 μ m) (Waters). Faza mobilă a constatat în: eluent A, 100% apă care conține 2mm formiat de amoniu și 160 μ L de acid formic; eluent B, metanol 100% ce conține formiat de de amoniu 2mm și 160 μ L de acid formic (pH 3.5).

Dectecția s-a bazat pe masa exactă calculată și pe timpul de retenție a compușilor țintă (tabelul 4.1.). Datele au fost procesate și evaluate cu ajutorul softurilor Quan Browser Xcalibur 0606 (Thermo Fisher) și ToxID Thermo (versiunea 2.1.1., Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA).

Parametrii de evaluare ai metodei

În scopul de a evalua coeficienții de recuperare, influența matricei, selectivitatea și sensibilitatea metodelor au fost efectuate mai multe teste prin îmbogățirea probelor de apă cu amestecul de compuși la diferite niveluri de concentrație: 1, 50 și 100 ng L⁻¹.

4.3. Rezultate și discuții

4.3.1. Purificarea prin extracție în fază solidă

În ceea ce privește prepararea probelor, dificultatea matricei de apă naturală este de a reduce cantitatea de materie organică dizolvată, formată în principal din acid humic și fulvic. Volumului probei, pH-ul, solventii de spălare și eluție a extracției SPE, au fost optimizate în acest studiu, pentru a îmbunătăți eficiența extracției. Având în vedere valorile pKa (constanta de disociere) a compușilor, cuprinse între 2-7, pH-ul de 3,0 a fost selectat pentru că cei mai mulți dintre acești compuși nu sunt ionizați la această valoare a pH-ului, crescând astfel șansa să fie reținuți de către cartușele StrataX utilizate (adevate pentru polaritate moderată sau scăzută).

Potrivit literaturii de specialitate (Batt și Aga 2005), oxitetraciclina poate forma complexe cu metalele matricei, însă, prin adăugarea unui agent de chelare în probă și ajustarea pH-ului în jurul valorii de 3 înainte de extracția SPE, această problemă poate fi evitată. Adăosul de 10 μL de Na₂EDTA 0,5 M la 100 mL de proba de apă a crescut recuperarea oxitetraciclinei la valori în intervalul de 75-85%.

Volume de probă de 200 și 100 ml au fost testate în aceeași condiții de extracție. A fost utilizat un volum al probei de 100 mL, suficient pentru a asigura omogenitatea acesteia, detecția compușilor ținând cont de sensibilitatea metodei și o cât mai mică influență a matricei.

Soluții apoase ce conțin 15, 20, sau 30% metanol și o soluție de 1% acid acetic conținând 15% metanol, au fost testate pentru a spăla cartușul SPE înainte de eluția analizilor. O spălare suplimentară cu 6 mL apă aplicată înainte de spălarea cu soluția metanolică, s-a dovedit a fi

eficientă în reducerea supresiei. Efectul matricei a scăzut odată cu creșterea conținutului de metanol în soluțiile de spălare, însă în detrimentul recuperării analitului (Figura 4.3., 4.4.).

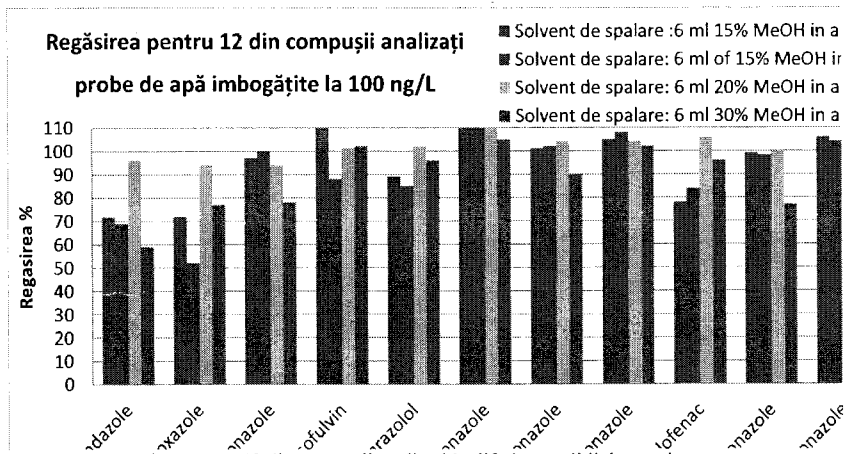


Figura 4.3. Regăsirea pentru 12 din compușii analizați în diferite condiții de reacție

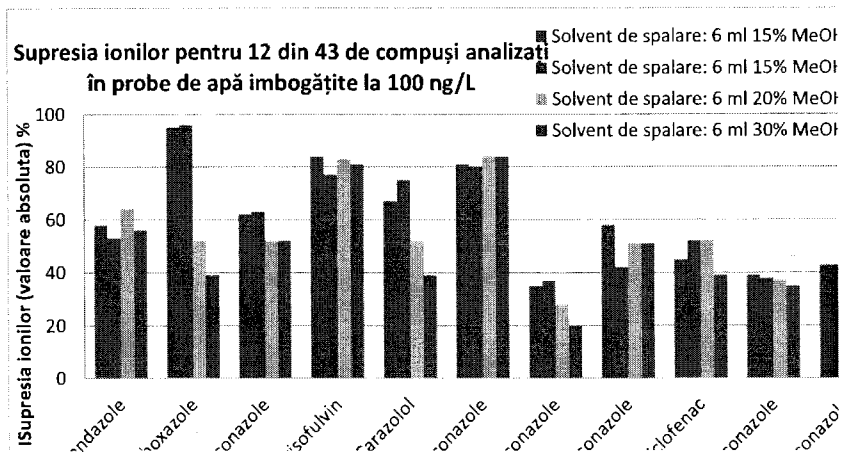


Figura 4.4. Supresia ionilor pentru 12 din compușii analizați în diferite condiții de reacție

De asemenea, au fost testați mai mulți solvenți de eluare: metanol, metanol: acetonă în proporții diferite (50:50; 10:90). Dacă recuperarea analiților a fost comparabilă, s-a observat însă o creștere semnificativă a supresiei în cazul amestecurilor metanol: acetonă .

Evaluarea coeficienților de recuperare a metodei finale, a concluzionat că 74% dintre compuși au o recuperare peste 80%, 15% dintre compuși au o recuperare între 60% și 80%, 7% dintre compuși au recuperarea între 30% și 60%, și itraconazolul are o recuperare sub 10%.

Nivelul de detecție a fost de 10 ng L⁻¹ pentru 61% dintre compuși, 50 ng L⁻¹ pentru 32%, 100 ng L⁻¹ pentru 5% iar nistatina nu poate fi detectată în probele de apă.

4.3.2. Analiza MS

Rezoluția înaltă a aparatelor Orbitrap permite alegerea unei fereaste înguste de extracție a masei la procesarea datelor, ceea ce îmbunătățește raportul semnal/zgomot și contribuie la o atribuire corectă a maselor.

În acest studiu, pentru prelucrarea rezultatelor, a fost stabilită o toleranță de 10 ppm, ceea ce a asigurat o acuratețe pe deplin satisfăcătoare, după cum se arată în tabelul 4.1.

Măsurătorile s-au realizat atât în modul de funcționare ESI(+) - ionizare pozitivă cât și ESI(-) ionizare negativă. Ionizarea pozitivă a fost preferată pentru detecția majorității analiților cu excepția acidului clofibrinic, dicloxacilinei și protoconazolului.

Cu unele excepții, s-a observat că formarea aducților cu ionul amoniu [M+NH₄]⁺ sau sodiu [M+Na]⁺ nu este frecventă în sistemul de ionizare al spectrometrului Orbitrap Exactive.

Teoretic, modul de achiziție a datelor prin scanare completă a probei, face ca toți compușii eluați din coloana cromatografică să fie măsurați de către detector și selectați după aceea din totalitatea ionilor TIC (total ions current), permițând creșterea teoretic nelimitată a numărului de compuși detectabili, fără pierderi de sensibilitate.

Pentru a demonstra aceasta aproximativ 260 compuși suplimentari, incluzând amestecuri de substanțe farmaceutice de uz veterinar și uman, și 162 de pesticide diferite, la un nivel de concentrație de 100 ng L⁻¹, au fost adăugați împreună în diferite probe de apă. Probele au fost prelucrate prin metoda descrisă și analizate. Evaluarea rezultatelor a arătat că 89% din medicamente și 91% din pesticide, au fost detectate.

4.4. Validarea metodei și analiza probelor

Procedura de validare se bazează pe Ghidul de validare a metodelor de screening pentru reziduurile de medicamente veterinare pentru Laboratoarele Comunitare de Referință 20/1/2010. Conform literaturii (EMA/CVMP/ERA/418282/2005), concentrația de 100 ng L⁻¹ a fost considerată ca fiind relevantă pentru apa de suprafață cât și pentru cea freatică, iar concentrația țintă a screening-ului a fost stabilită la 50 ng L⁻¹ (1/2 din valoarea de interes).

Rezultatele studiului de validare, incluzând limita de detecție, recuperarea maximă, capacitatea de CCβ, media și deviația standard a erorii de masă (Δppm), sunt prezentate în tabelul 4.1.

Tabel 4.1 Rezultatele studiului de validare

Compus	Limita de detecție (ng L ⁻¹)	Regăsirea maximă %	CCβ ng L ⁻¹	Media Δppm	St dev Δppm
Flubendazol	10	80	50	1.08	0.91
Eritromicină	50	87	100	2.48	3.85
Dicloxacilină	100	80	-	2.46	3.07
Ciprofloxacină	100	68	100	2.93	2.85
Sulfamethoxazol	10	82	10	0.70	0.59
Oxitetraciclină	50	85	50	3.00	1.69
Carazolol	10	96	10	1.09	0.95
Diclofenac	10	102	50	1.15	0.77
Acid meclofenamic	50	77	100	1.69	1.60
Carbamazepină	10	103	50	1.03	0.58
Acid clofibrice	10	99	100	0.26	1.47
Nistatină	Nedetectat	-	-	-	-
Natamicină	50	48	100	1.87	1.34
Enilconazol	10	90	10	0.75	0.52
Ketoconazol	50	73	50	2.06	1.27
Fluconazol	50	97	50	1.57	0.93
Clotrimazol	10	103	50	1.05	1.13
Miconazol	10	66	50	0.69	0.62
Itraconazol	100	4	-	0.40	1.27
Griseofulvin	50	80	100	0.73	0.52
Voriconazol	10	102	10	0.95	0.70
Thiabendazol	10	93	10	0.70	0.43
Difenoconazol	10	67	50	0.66	0.57

Hexaconazol	10	80	10	0,66	0,45
Penconazol	10	81	10	0,65	0,46
Propiconazol	10	80	10	0,91	0,58
Paclobutrazol	10	103	10	1,10	0,69
Prochloraz	110	84	10	0,70	0,62
Tebuconazol	50	86	10	0,78	0,67
Bromuconazol	50	86	50	1,76	1,50
Ciproconazol	10	92	50	1,11	0,77
Epoxiconazol	10	80	10	1,00	0,52
Fenbuconazol	10	75	50	0,91	0,59
Fluquinconazol	50	74	-	2,19	1,94
Flusilazol	10	82	10	0,69	0,53
Flutriafol	10	84	10	0,96	0,69
Metconazol	10	81	10	0,62	0,38
Prothioconazol	50	32	-	1,31	1,81
Terconazol	50	86	-	1,12	2,47
Miclobutanii	10	82	50	1,08	0,62
Triticonazole	10	83	50	1,00	0,68
Carbendazim	10	98	10	0,59	0,43
Metaxil	10	88	50	0,73	0,55

4.5. Confirmarea LC- MS/MS

În acest studiu, pe parcursul validării unele probe au prezentat niveluri ale concentrației de contaminanți mai mari decât nivelul validat, indicând contaminarea. Extractul probelor suspecte a fost reinjectat într-un sistem triplu quadrupolar MS / MS (Xevo CT, Waters) echipat cu o interfață electrospray, cuplat cu un sistem UPLC Acquity UPLC (Waters) pentru confirmarea identității contaminantului.

Achiziția datelor s-a realizat prin monitorizarea simultană a mai multor procese de disociere (multiple reaction monitoring mode - MRM).

În toate probele suspecte a fost confirmată prezența compușilor farmaceutici sau antifungici (Tabelul 4.2).

Alături de contaminanții raportați în mod obișnuit de studiile efectuate în acest domeniu (Stolker et al., 2004): sulfametoxazol, carbamazepină, diclofenac, eritromicină, acest studiu a pus în

evidență prezența în apă a compușilor antifungici ca: fluconazol, ketoconazol, thiabendazol. În toate probele de apă de adâncime s-a detectat prezența a cel puțin unul dintre compușii studiați, interesantă fiind prezența constantă a ketoconazolului. Acesta este un antifungic utilizat în medicina umană și veterinară, fiind totodată și un component al unor produse cosmetice ca șampoane sau creme, fiind cunoscut ca având o remanență mare în sol. În apa de suprafață nivelul de contaminare a fost mai mare decât în cazul apelor freatice, nedepășindu-se totuși în nici o probă analizată nivelul de 100 ng L^{-1} .

4.6. Problematika rezultatelor fals pozitive și fals negative pentru metodele de screening

O altă consecință a compexității multimetodelor sunt problemele legate de rezultatele fals.

În analizele de rutină a sute de probe se folosesc pentru prelucrarea datelor softuri complet automatizate, care nu presupun evaluarea fiecărei cromatograme de către analist. Softurile actuale însă, nu permit uneori o diferențiere clară a picurilor, iar rezultatele fals pozitive apar și în cazul analizei solvenului de spălare a sistemului sau a probelor blank de apă ultrapură. Aceasta impune analize confirmatorii pentru aproape toate probele și face practic screeningul inutil.

Pentru ca acest gen de analiză să își poată găsi o utilizare eficientă în aplicațiile de rutină, sunt necesare elemente de confirmare, măcar pentru acei compuși care "apar" și în probelor de apă ultrapură sau în solvenți sau îmbunătățirea softurilor așa încât să permită distincția între un pic fals și unul real.

O soluție ar putea fi căutarea picurilor izotopice sau fragmentarea compușilor în celula de fragmentare a spectrometrului Orbitrap, urmată de scanare completă și găsirea de fragmente cât mai caracteristice.

Un astfel de experiment a fost efectuat cu ajutorul Orbitrap Exactive folosind celula de fragmentare a aparatului. Energia de fragmentare a fost setată la 32eV.

Cu ajutorul programului HighChem Mass Frontier 6.0. s-au simulat toate fragmentările posibile ale următorilor compuși: carabamazepină, carbendazim, ciproconazol, flubendazol, tebuconazol, sulfamethoxazol, enilconazol, metalaxil și thiabendazol.

Table 4.2. Evaluarea analizelor LC-MS/MS pentru confirmarea contaminării probelor prelevate din Olanda

Probă apă	Descriere	Carbamazepina			Didofenac			Nivel			Eritromicină			Sulfamethoxazol			Ketoconazol		
		Full scan	MS-MS	Nivel ng/L	Full scan	MS-MS	Nivel ng/L	Full scan	MS-MS	Nivel ng/L	Full scan	MS-MS	Nivel ng/L	Full scan	MS-MS	Nivel ng/L	Full scan	MS-MS	Nivel ng/L
1	Vallier Canal near Veerendaal	suspect	confirmat	25-50	neg	neg	neg	neg	confirmat	25-50	suspect	confirmat	75-100	neg	neg	neg	neg	confirmat	50-75
2	Canal near Renswoude	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	River De Zaan near Wormerveer	suspect	confirmat	25-50	neg	neg	neg	neg	confirmat	50-75	suspect	confirmat	75-100	neg	neg	neg	neg	confirmat	50-75
4	Kromme Rijn near Cothen	suspect	confirmat	25-50	neg	neg	neg	neg	confirmat	50-75	suspect	confirmat	75-100	neg	neg	neg	neg	confirmat	50-75
5	Lake near Huisen	suspect	confirmat	50-100	neg	neg	neg	neg	confirmat	50-75	suspect	confirmat	75-100	neg	neg	neg	neg	confirmat	50-75
6	River De Lingre near Heteren	suspect	confirmat	10-25	neg	neg	neg	neg	confirmat	50-75	suspect	confirmat	75-100	neg	neg	neg	neg	confirmat	50-75
7	Haarrijnse Plas	suspect	confirmat	<10	neg	neg	neg	neg	confirmat	<10	suspect	confirmat	<10	neg	neg	neg	neg	confirmat	<10
8	Amsterdam Rijn canal	suspect	confirmat	25-55	neg	neg	neg	neg	confirmat	25-50	suspect	confirmat	25-50	neg	neg	neg	neg	confirmat	25-50
9	Groundwater near Erdem	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	confirmat	25-50
10	Groundwater Kolkstraat Dodewaard	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	confirmat	25-50
11	Groundwater Heelsum bosgrond	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	confirmat	25-50
12	Canal near Naarden	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	confirmat	10-25
13	Canal near Veerendaal	suspect	confirmat	25-50	neg	neg	neg	neg	confirmat	75-100	suspect	confirmat	75-100	neg	neg	neg	neg	confirmat	<10

Probă apă	Descriere	Fluconazol			Carbendazim			Nivel			Propiconazol			Thiabendazol			Enilconazol		
		Full scan	MS-MS	Nivel ng/L	Full scan	MS-MS	Nivel ng/L	Full scan	MS-MS	Nivel ng/L	Full scan	MS-MS	Nivel ng/L	Full scan	MS-MS	Nivel ng/L	Full scan	MS-MS	Nivel ng/L
1	Vallier Canal near Veerendaal	neg	neg	neg	suspect	confirmat	50-100	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	Canal near Renswoude	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	River De Zaan near Wormerveer	neg	neg	neg	suspect	confirmat	25-50	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4	Kromme Rijn near Cothen	neg	neg	neg	suspect	confirmat	10-25	suspect	confirmat	<10	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	Lake near Huisen	suspect	confirmat	5-50	suspect	confirmat	25-50	neg	neg	confirmat	<10	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	River De Lingre near Heteren	neg	neg	neg	suspect	confirmat	<10	suspect	confirmat	<10	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7	Haarrijnse Plas	neg	neg	neg	suspect	confirmat	25-50	suspect	confirmat	<10	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
8	Amsterdam Rijn canal	neg	neg	neg	suspect	confirmat	25-50	suspect	confirmat	<10	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
9	Groundwater near Erdem	neg	neg	neg	suspect	confirmat	25-50	neg	neg	confirmat	<10	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
10	Groundwater Kolkstraat Dodewaard	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
11	Groundwater Heelsum bosgrond	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
12	Canal near Naarden	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
13	Canal near Veerendaal	neg	neg	neg	suspect	confirmat	25-50	neg	neg	confirmat	10-25	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

S-au analizat probe de solvent, apa ultrapură, probe de apă, probe de apă îmbogățite cu soluții standard la concentrații de 50 și 100 ng L⁻¹, soluții standard. În urma fragmentării s-au identificat în spectrul de masă obținut fragmentele posibile fiecare substanță în parte, atât pentru soluțiile standard cât și pentru probele de apă îmbogățite.

Folosirea aceluiași soft pentru prelucrarea automată a datelor (ToxID) în cazul probelor de solvent sau apă pură nu a indicat de data aceasta contaminarea.

4.7. Rezultatele screeningului pentru probelor colectate din râuri din România

Nouă probe din râuri importante din România și o probă de apă potabilă au fost supuse unei analize de screening conform procedurii descrise. S-au analizat probele de apă menționate, la care s-au adăugat aceleași probe îmbogățite la un nivel de concentrație de 50 ng L⁻¹ precum și probe blank de apă ultrapură și probe de apă ultrapură îmbogățite la aceeași concentrație, pentru o evaluare cât mai corectă a rezultatelor. La lista de compuși descrisă în Tabelul 4.1. s-au adăugat: trimetoprimul $[M+H]^+ = 291,14513$; amoxicilina $[M-H]^- = 364,09728$; sulfadiazina $[M+H]^+ = 251,05970$; lincomicina $[M+H]^+ = 407,22100$; tilozina $[M+H]^+ = 916,52642$; tiamulinul $[M+H]^+ = 494,32982$; ivermectina $[M+HH_4]^+ = 892,54173$; doxicilina $[M+H]^+ 445,16054$.

Prelucrarea rezultatelor s-a realizat cu ajutorul softului Xcalibur, prin evaluarea fiecărei cromatograme în parte. Extracția compușilor din TIC s-a făcut cu o toleranță a masei de 10 ppm, într-o fereastră de timp de ± 20 sec față de timpul de retenție al standardului.

Probele provin din locațiile descrise în Tabelul 4.3.

Rezultatele screeningului au arătat faptul ca apele de pe teritoriul României sunt contaminate cu reziduuri de produse farmaceutice, atât de uz uman cât și de uz veterinar (Tabel 4.4.). Contaminanții detectați sunt cei descriși în general de literatură (Stolker et al., 2004) (Figura 4.5 și 4.6.). O noutate ar fi prezența în râul Jijia a griseofulvinului, un antifungic de uz veterinar, care însă nu se mai prescrie de mult timp, utilizarea lui fiind interzisă în UE.

Totodată, de menționat este și prezența diclofenacului în apa potabilă într-o concentrație de aproximativ 50 ng L⁻¹, ceea ce depășește nivelul maxim admisibil pentru medicamentele de uz uman prevăzut de EMEA/CHMP/SWP/4447/00 (2006).

Singura probă necontaminată a fost proba colectată din râul Timiș (Jud. Brașov), râu care, până la locul de colectare (Orașul Brașov) nu traversează localități în care se află spitale.

Tabelul 4.3. Sursele probelor de apă colectate din România

Nr. probă	Sursa probelor de apă
1	Râu Prahova – locația: după parcurgerea orașului Sinaia
2	Râu Prahova – locația: după parcurgerea orașului Bușteni
3	Râu Timiș – locația: oraș Brașov
4	Fluviu Dunarea – locația: înainte de intrarea în orașul Galați
5	Fluviu Dunarea – locația: după parcurgerea orașului Galați
6	Apă potabilă – sursa: Dunare
7	Râul Siret – locația: înainte de vărsare în fluviul Dunarea
8	Râul Prut - locația: localitatea de granită Albița (Jud. Iași)
9	Râul Jijia - locația: în apropierea orașului Iași.
10	Lac în vecinătatea localității Huși (Jud. Iași)

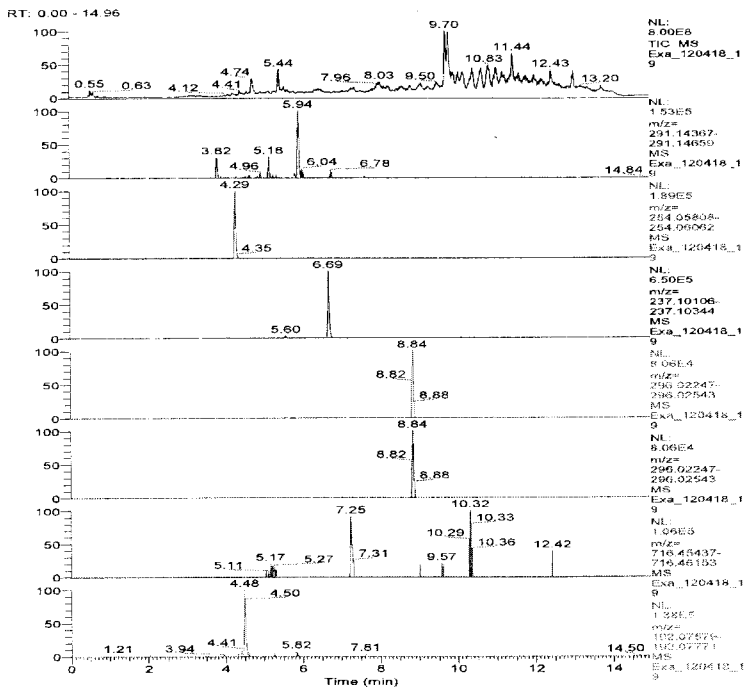


Figura 4.5. Cromatograma LC-Orbitrap MS a probei nr 8 – Râu Prut. De sus in jos: trimetoprim m/z 291.14513; sulfamethoxazol m/z 254,05935; carbamazepină m/z 237,10225; diclofenac m/z 296.02395; eritromicină m/z 716,45795, carbendazim m/z 192,07675

Tabel 4.4. Rezultatele screeningului pentru probele de apă colectate din România

Contaminant	Proba nr. 1 ng L ⁻¹	Proba nr. 2 ug L ⁻¹	Proba nr. 3 ng L ⁻¹	Proba nr. 4 ng L ⁻¹	Proba nr. 5 ug L ⁻¹	Proba nr. 6 ng L ⁻¹	Proba nr. 7 ng L ⁻¹	Proba nr. 8 ng L ⁻¹	Proba nr. 9 ng L ⁻¹	Proba nr. 10 ng L ⁻¹
Trimeroprim	>10	~ 10				15-20	15-20	10-15		
Sulfametoxazol	~ 15	~ 10		15-20	15-20	~ 30	~ 30	~ 30		
Carbendazim				<10	<10	<10	<10	<10	<10	
Carbamazepină	5-10	5-10		15-20	10-15	5-10	15-20	15-20	2.5	
Enilconazol				<5	<5		<5	<5	<5	
Diclofenac	20	<10		<10	20-25	45-50	35-40	25-30		10-15
Thiabendazol	<5			<5	<5	<5	<5	<5	<5	
Tebuconazol					~ 5	~ 5		<5	<5	
Fluconazol								<10	<10	
Griseofulvin								<5	<5	
Ciprofloxacină							10-15			
Eritromicină					25			20-25	15-20	
Clotrimazol								~ 10		

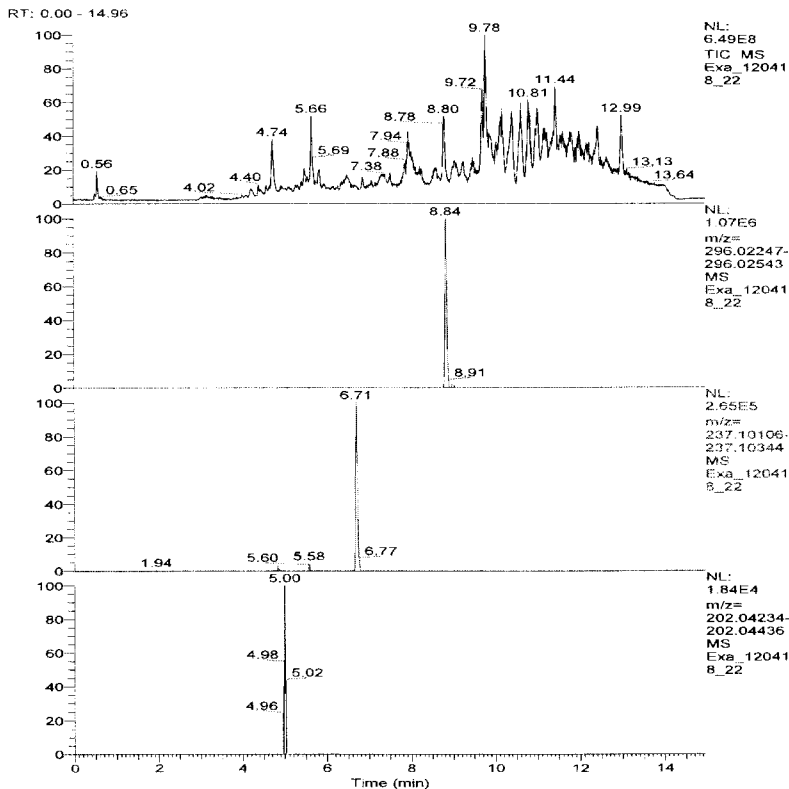


Figura 4.6. Cromatograma LC – Orbitrap MS a probei de apă potabilă. De sus în jos: diclofenac m/z 296,02395; carbamazepină m/z 237,10225; tiabendazol m/z 202,04335

4.8. Concluzii

În acest studiu, a fost aplicată cu succes o metodă de screening care asigură detecția a 42 de compuși printr-o singură scanare de înaltă rezoluție MS. Abordarea metodei este analiza post-target. Utilizarea suplimentară a U-HPLC oferă o rezoluție superioară cromatografică, ceea ce duce la o sensibilitate îmbunătățită. Datele actuale furnizate de Exactive Orbitrap arată o bună calitate în ceea ce privește acuratețea. Viteza de analiză este de asemenea crescută. Acestea sunt în mod clar avantaje, în comparație cu tehnologiile mai vechi.

Analiza probelor de apă colectate atât din Olanda, cât și din România au atestat contaminarea cu diferite substanțe farmaceutice și antifungice.

Mulțumiri

Mulțumesc institutului RIKILT-Wageningen University and Research Center pentru sprijinul acordat în derularea acestor analize.

Capitolul 5

Absorbția compușilor farmaceutici din sol de către plante

5.2. Partea experimentală

5.2.1. Descrierea solului folosit în experiment

În acest studiu au fost utilizate două tipuri de soluri nisipoase, caracteristice terenului arabil, din zona agricolă a Olandei, un sol omogen, având un conținut relativ ridicat de carbon organic datorită fertilizării organice și resturilor de recolte. Solurile au fost colectate în vara anului 2011 de la două ferme situate în apropiere de Harskamp și Wageningen, Olanda. pH-ul probelor de sol a fost de 4,5 și, respectiv, 5,5. Potrivit raportului RIVM din 2008, referitor la "Profilul ecosistemul sol, în Olanda", (Rutgers et al., 2008), s-a considerat pentru solurile nisipoase o valoare medie a materiei organice din sol (SOM) de 5,2%. După colectare solul a fost uscat în aer și trecut printr-o sită de 3 mm pentru a se asigura omogenitatea.

5.2.2. Descrierea plantelelor folosite în experiment

În acest studiu a fost folosit un amestec de semințe de specii de iarbă disponibil în magazinele specializate (75% English Ray Grass, *Lolium perenne*; 25% iarbă de câmp, *Poa pratensis*, *Poa trivialis*) și cresson (*Lepidium sativum*). Plantele au fost plantate din semințe.

5.2.3. Descrierea compușilor farmaceutici folosiți în experiment

Trei substanțe de testare au fost selectate pentru a acoperi diferite clase de medicamente de uz veterinar (sulfonamide, tetraciline, antifungice) și proprietăți fizico-chimice diferite (caracter hidrofil sau lipofil, potențialul de absorbție, mobilitatea și persistența în sol). Substanțele standard au fost procurate după cum urmează: de la Sigma-Aldrich Chemic BV (Zwijndrecht, Olanda), oxitetraciclina și sulfametoxazolul și de la EDQM (Strasbourg, Franța), ketoconazolul.

Contaminarea solului s-a făcut simultan cu toți compușii aleși, în concentrații de 5 mg kg^{-1} și 10 mg kg^{-1} (Figura 5.1). Concentrația de 5 mg kg^{-1} a fost selectată ca cel mai rău caz (worst case scenario) pentru reziduurilor de medicamente de uz veterinar măsurate în soluri. De asemenea, pentru comparație a fost folosită și o concentrație de 10 mg kg^{-1} .

5.2.4. Studiul de absorbție

Pentru acest studiu au fost folosite recipiente de plastic de capacitate 2,5 L ($\varnothing 18,5 \text{ cm}$) umplute cu câte 2 kg de sol (greutate uscată). Experimentul a fost proiectat în duplicat. Pentru fiecare probă sol / plantă au fost pregătite trei vase (două cu sol îmbogățit cu antibiotic și unul cu sol blank de control). Numărul total de vase a fost de 24. Au fost utilizate vase separate pentru speciile de plante.

Figura 5.1. Ilustrează modul de adăugare a compușilor în acest experiment.

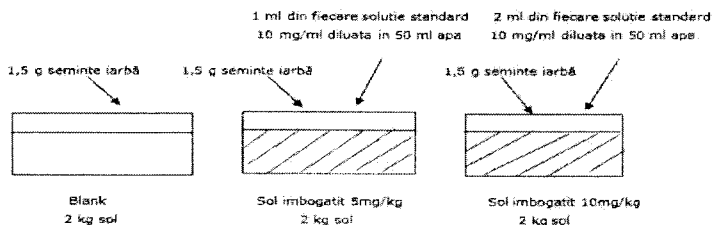


Figura 5.1: Îmbogățirea solurilor cu compușii testate

În centrul de fiecare vas a fost introdus vertical un tub PVC, cu un diametru de 2 cm și o lungime de 20 cm. În partea inferioară, tubul a fost găurit pe o porțiune de aproximativ 6 cm. Umidificarea solului s-a realizat prin aceste tuburi pentru a evita 'spălarea' contaminanților de la suprafață și migrarea acestora către partea inferioară a vaselor. Vasele au fost irigate pentru a menține un conținut de apă de aproximativ 50-60% din capacitatea de saturație a solului.

Experimentul a fost realizat într-un laborator al RIKILT, Universitatea Wageningen, în perioada iunie-august 2011. Temperatura a fost menținută constantă la $20 \text{ }^\circ\text{C}$, iar umiditatea la 70%. Vasele s-au udat la intervale de 2 zile cu apă ultrapură și s-au rotit pentru a egaliza expunerea la lumină.

După 8 săptămâni pentru iarbă iarbă și 6 săptămâni pentru creson, plantele au fost recoltate de la aproximativ 1,5 cm deasupra suprafeței solului. După tocare și omogenizare, materialul

vegetal proaspăt din fiecare vas a fost stocat în congelator, la - 20 °C, în tuburi de plastic, până la efectuarea analizelor.

5.2.5. Analiza materialului vegetal

Procedura de extracție ASE

Procedura validată este descrisă în cap 3.2. în studiul de dezvoltare al metodei ce include același grup de compuși, pe matricea de sol și material vegetal.

Recuperarea celor trei compuși investigați din matricea de materialul vegetal a fost de: 53% pentru oxitetraciclină, 59% pentru ketoconazol, și 60% pentru sulfametoxazol.

Instrumentația folosită la analiza compușilor

Pentru analize a fost folosit un sistem LC-MS de scanare completă: Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific), cuplat la un cromatograf de lichide de ultra presiune (U-HPLC) (Thermo Scientific Accela TM). Condițiile analizei sunt cele descrise la capitolul 3.2.

Extractul probelor suspecte a fost reinjectat într-un sistem triplu quadrupolar MS/MS (Xevo CT, Waters) echipat cu o interfață electrospray, cuplat cu un sistem UPLC Acquity UPLC (Waters) pentru confirmarea identității contaminanților.

Liniaritatea metodei analitice a fost bună ($R > 0,99$) pe domeniul de concentrație 0-50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Limitele de detecție pentru sulfametoxazol, oxitetraciclină și ketoconazol, calculate pe baza curbelor de calibrare, au fost de: 4,4 g kg^{-1} , 2,6 g kg^{-1} și respectiv 1,1 g kg^{-1} .

5.3. Estimarea concentrației absorbite

Modelul partiției consideră transportul pasiv al moleculelor mici - cum ar fi pesticide, fungicide, antibiotice, produse farmaceutice - din apa interstițială din sol în plantă (Chiou et al, 2001; Montforts, 2006.).

Modelul este exprimat ca:

$$C_w = \frac{C_{soil}}{F_{oc} \cdot K_{oc} + K_{oc}} \quad \text{Ec.5.1.}$$

$$C_{pt} = \alpha \cdot p_t \cdot C_w \cdot [f_{pw} + f_{ch} \cdot K_{ch} + f_{lip} \cdot K_{lip}], \quad \text{Ec.5.2.}$$

Unde:

C_w – concentrația substanței active în apa interstițială (mg/kg);

C_{soil} – concentrația substanței active în sol (mg/kg);

C_{pt} – concentrația substanței active în plantă (mg/kg);

$F_{oc\ soil}$ – fracția de carbon organic din sol;

K_{oc} – coeficientul de partiție carbon organic din sol – apă;

α_{pt} – constanta de evazi-echilibru;

f_{pw} – procentul de apă din compoziția plantei;

f_{ch} – procentul de carbohidrați din compoziția plantei

f_{lip} – procentul de lipide din compoziția plantei;

K_{ch} – coeficientul de partiție pentru carbohidrații din plantă;

K_{lip} – coeficientul de partiție pentru lipidele din plantă;

K_{ow} – coeficientul de partiție octanol – apă.

Se considera $K_{lip} \sim K_{ow}$ și suma carbohidraților, proteinelor și celulozei din plantă ca având același coeficient de partiție

$K_{ch} \cdot \alpha_{pt} = 1$ denotă o stare de echilibru.

Compoziția ierbii și a creson-ului a fost aproximată la: 88,8% apă, 0,97%, lipide și glucide 10,2% (Li et al, 2005.).

Valorile estimate în cazul contaminării solului cu produsele farmaceutice menționate la o concentrație de 5 mg kg^{-1} sunt: $15\text{-}50\ \mu\text{g kg}^{-1}$ pentru sulfametoxazol; $0,09\text{-}0,15\ \mu\text{g kg}^{-1}$ pentru oxitetraciclină; $50\text{-}75\ \mu\text{g kg}^{-1}$, pentru ketoconazol (folosind valoarea estimată a $K_{ow} = 3.84$).

5.4. Rezultate și discuții

Asimilarea compușilor selectați a fost evaluată prin extracția compușilor din plantele în stare proaspătă și analiză UHPLC – MS/MS. Atât iarba și cresonul au absorbit sulfametoxazol și ketoconazol. Oxitetraciclina nu a fost detectată în nici o probă. Antibioticele nu au fost detectate în probele de control. Concentrațiile sunt raportate la greutatea vegetalelor în stare proaspătă.

Date detaliate pentru absorbția de către plantele expuse a contaminanților din solurile îmbogățite la 5 și 10 micrograme kg^{-1} cu compușii selectați sunt prezentate în tabelul 5.1.

Tabel 5.1. Valorile experimentale ale absorbției de către plante ale compușilor folosiți în studiu

Proba	Cantitatea de substanță absorbită ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
	Sulfamethoxazol	Oxitetraciclina	Ketoconazol
iarbă în sol 1_îmbogățit la 5 mg kg^{-1}	21,5	< LD	< LD
iarbă în sol 1_îmbogățit la 5 mg kg^{-1}	10,5	< LD	1,7
iarbă în sol 1_îmbogățit la 10 mg kg^{-1}	17,5	< LD	2,9
iarbă în sol 1_îmbogățit la 10 mg kg^{-1}	12,9	< LD	1,7
iarbă în sol 2_îmbogățit la 5 mg kg^{-1}	7,1	< LD	< LD
iarbă în sol 2_îmbogățit la 5 mg kg^{-1}	6,8	< LD	2,0
iarbă în sol 2_îmbogățit la 10 mg kg^{-1}	14,5	< LD	1,7
iarbă în sol 2_îmbogățit la 10 mg kg^{-1}	5,0	< LD	1,9
Creson în sol 1_îmbogățit la 5 mg kg^{-1}	4,9	< LD	2,4
Creson în sol 1_îmbogățit la 5 mg kg^{-1}	4,1	< LD	< LD
Creson în sol 1_îmbogățit la 10 mg kg^{-1}	7,0	< LD	< LD
Creson în sol 1_îmbogățit la 10 mg kg^{-1}	4,2	< LD	< LD
Creson în sol 2_îmbogățit la 5 mg kg^{-1}	6,6	< LD	7,0
Creson în sol 2_îmbogățit la 5 mg kg^{-1}	--	< LD	< LD
Creson în sol 2_îmbogățit la 10 mg kg^{-1}	4,5	< LD	< LD
Creson în sol 2_îmbogățit la 10 mg kg^{-1}	7,5	< LD	7,0

Legătura dintre procesul de absorbție și proprietățile fizico-chimice ale contaminanților

Absorbția compusilor organici neionici din sol de către rădăcinile plantelor este considerată a fi un proces de partiție și, în general, aceasta crește cu creșterea caracterului hidrofil al unui compus (Wu et al., 2010). Pe de altă parte, asimilarea compușilor ionizabili este determinată de caracterul hidrofob de pKa, precum și de pH-ului substratului (Trapp, 2000). La un pH al solului cuprins între 4,5 și 5,5, sulfamethoxazolul este predominant sub formă de neutră, oxitetraciclina este de 50% în formă neutră și 50% în forma ionizată și ketoconazolul este de 70-80%, în formă ionizată (software MarvinSketch). Pentru compușii organici ionizabili, forma lor neutră favorizează, în general, asimilarea de către rădăcini, în timp ce ionizarea poate reduce bioacumularea acestora lor în plante (Rabolle și Sqliid, 2006).

Rezultatul obținut pentru oxitetraciclina, în conformitate cu valorile estimate, poate fi explicat prin proprietățile sale. Asimilarea oxitetraciclina este dependentă de pH: este cea mai mică la pH 5,0 și cea mai mare la pH 7,0. Această tendință este legată de disocierea oxitetraciclina în condiții diferite de pH-ului sub forma de zwitterion, ceea ce favorizează absorbția (Kong, et

al., 2007). Ionizarea oxitetraciclinei poate influența în mod semnificativ comportamentul acesteia în sol, incluzând aici hidroliza în apă și absorbția pe componentele solului (Chen și Huang, 2003). Oxitetraciclina poate forma complecși stabili cu cationi de metal din sol, influențând astfel absorbția sa (Andreu et al, 2009; Jones et al, 2005.). Odată ce este adsorbită în sol, desorbția oxitetraciclinei se realizează greu, fapt sugerat de valoarea Koc: doar 0.5-2.3% este eliberată din lut și nisip argilos (Rabolle și Sqliid, 2006).

Coefficienții de absorbție în sol ai sulfonamidelor sunt foarte mici (Boxall et al., 2002), ceea ce indică faptul că sulfonamidele sunt mai biodisponibile. La pH-ul solului de 4,5 - 5,5 sulfametoxazolul este aproape complet în formă neutră, iar acest lucru înseamnă că absorbția și transportul în plantă urmează un model de transport pasiv, după modelul de partiție cu factorul de cvasi-echilibru $\alpha \approx 1$. Ca ordin de mărime rezultatele obținute sunt în concordanță cu valoarea estimată.

Asimilarea ketoconazolului, într-o concentrație de $2-5 \text{ g kg}^{-1}$, în contradicție cu valorile estimate, sugerează că absorbția și translocarea ketoconazolului în frunze prin fluxul de apă, este scăzută. Această afirmație este susținută de studii de translocare a substanțelor organice în diferite plante, indicând faptul că relația dintre absorbție și $\log Kow$ este reprezentată printr-o curbă de distribuție gaussiană (Briggs et al., 1982).

Translocația maximă a fost observată la un $\log Kow$ în jur de 1,7-1,8 în timp ce absorbția compușilor cu caracter puternic lipofil ($\log Kow > 4.5$) este scăzută. Foarte interesantă este observația lui Hsu (1990), care stabilește o legătură printr-o distribuție gaussiană între absorbție, conținutul de substanțe organice din sol (SOM) și $\log Kow$. Astfel absorbția compușilor organici din sol este maximă în jurul valorii $\log Kow$ 1-1,2 fiind cu atât mai scăzută cu cât conținutul de SOM este mai mare. Însă atunci când creșterea plantelor se face fără sol, hidroponic, absorbția maximă se realizează la o valoare de 3-3,2 a $\log Kow$ pentru contaminați.

La pH-ul solului (4.5-5.5), ketoconazol este ionizat în proporție de 70-80%, iar modelul folosit în estimare bazat pe partiția unui transport pasiv nu mai este potrivit pentru modelarea cantității absorbite. Totodată, absorbția scăzută a ketoconazolului poate fi, explicată prin valoarea Koc relativ mare (disponibilitate redusă), prin caracterului lipofil, ceea ce determină asocierea cu materia organică în sol (Kipopoulou et al., 1999) și prin masa moleculară a substanței ce depășește 500 g mol^{-1} (Kumar et al., 2005 b).

Pe baza rezultatelor experimentale, valoarea calculată a factorului de cvasi-echilibru, derivat din Ec.5.2. este $\alpha \approx 0,1$.

5.5. Concluzii

Studiul demonstrează încă o dată capacitatea plantelor de a absorbi compușii farmaceutici din solurile fertilizate. Concentrația de produse farmaceutice efectiv disponibilă pentru a fi preluată de către plante este considerată a fi concentrația din apa interstițială, care poate fi estimată și calculată. Compoziția solului influențează concentrația de reziduuri farmaceutice în apa interstițială prin conținutul de materie organică din sol (SOM). Concentrația de reziduuri farmaceutice, în diferite părți ale plantei pot sau nu în echilibru cu concentrația acestora în apa externă.

Modelul partiției dă rezultate satisfăcătoare pentru transportul pasiv al sulfametoxazolului. În cazul compușilor foarte lipofili, cum ar fi ketoconazol, există o corelație inversă între factorul de cvasi-echilibru (μ_{pt}) și valoarea K_{ow} , absorbția din sol fiind, prin urmare, redusă.

Capitolul 6

Evaluarea contaminării pe lanțul animal-sol-plante-animal

6.1. Introducere

Luând în considerare practica agricolă de utilizare a gunoiului de grajd ca fertilizator, în acest capitol se evaluează, prin modelare matematică, transferul de produse farmaceutice de la animale la sol, plante și din nou la animale de la care se obțin produse (carne și lapte) utilizate în alimentația umană.

Punctul de plecare într-un exercițiu de evaluare a contaminării mediului cu produse farmaceutice este, în mod firesc, legislația europeană și ghidurile aferente acestora cu privire la metodologia și modele de calcul.

Țara noastră nu are tradiție în utilizarea pe scară intensivă a gunoiului de grajd ca fertilizator pentru terenuri agricole, acest lucru făcându-se mai mult în sistem gospodăresc, în mod sporadic și probabil necontrolat. De aceea, modelul aplicat în acest studiu pleacă de la o situație concretă dintr-o anumită zonă din Europa (Olanda), având la dispoziție informații privind practicile agricole și veterinare, utilizarea terenurilor, utilizarea fertilizatorilor și reglementările specifice. Acest lucru nu exclude aplicabilitatea modelului și la noi în țară, pe arii mai restrânse și eventual cu mici modificări, ținând de particularitățile întâlnite.

6.2. Parametrii scenariului

În mod realist, cel mai defavorabil caz trebuie să se bazeze pe practica agricolă de zi cu zi. Agricultură olandeză prezintă un număr de caracteristici distincte: colectarea și păstrarea în condiții optime a gunoiului de grajd; timpul de aplicare a gunoiului de grajd în anumite

regiuni limitat la perioada martie-septembrie și împărțit în patru evenimente de împrăștiere: unul la începutul sezonului, unul la sfârșit, iar celelalte două la intervale egale, ceea ce face ca gunoiul împrăștiat la începutul sezonului să aibă o durată de depozitare de 152 zile, iar celelalte loturi de 71 de zile; injectarea la 5 cm adâncime sau în cazul cultivării directe la 20 cm adâncime; terenuri întinse pentru zonele de pășunat pentru bovine și ovine.

Sunt posibile trei scenarii de contaminare a solului: excreția directă a bovinelor în zonele de pășunat; fertilizarea terenurilor (arabil și pășuni) cu gunoi de grajd; folosirea apelor reziduale pentru irigații.

Scenariul ales pentru acest studiu de modelare cuprinde trei substanțe active din clase terapeutice diferite și având proprietăți fizico-chimice diferite, administrate în doze terapeutice și subterapeutice, trei specii de păsări de crescătorie: pui broileri, curcani, găini ouătoare, și consideră contaminarea ca urmare a fertilizării unui teren de pășunat.

Se consideră că fiecare pasăre va primi un singur tratament terapeutic pe timpul ciclului de viață. Modelul ia în considerare fracția de substanță activă excretată în balegar și rata de degradare a acestuia atât în balegar cât și în sol. Nu s-au avut în vedere metaboliții substanțelor considerate.

Se va considera modelul olandez de fertilizare a pășunilor, ce cuprinde 4 sezoane de fertilizare în intervalul martie-septembrie, cu injectarea la 5 cm adâncime a noroiului de fertilizare. Se presupune că gunoiul de grajd cu care se face fertilizarea provine de la crescătorii de păsări.

Se va considera că o turmă de bovine pasc libere pe pășunile respective și se va estima cantitatea de reziduuri farmaceutice din carnea și laptele acestora.

Pentru transferul contaminanților din sol în apă se consideră că fracția biodisponibilă este conținută de apa interstițială și absorția urmează modelul partiției ($\alpha_{pt} \leq 1$).

6.4. Descrierea modelului

6.4.1. Estimarea cantității de contaminant în sol

Adoptând un algoritm pentru modelul propus de Montfort (2005), formulele de calcul a cantității predictibile de contaminant în sol folosite în acest studiu sunt următoarele:

Calcularea PEC pentru broileri (pui de carne):

$$Q_{excr} = Q_c * T_t * F_{excr} * M_{anim} * N_{ciclu\ anim} \quad \text{Ec.6.1.}$$

$$CnA = \frac{Q1 \text{ exctr} \sum_{i=1}^n \binom{n}{i} e^{-kdeg \cdot (T1 - i\tau)}}{T1 \cdot Pn}, \text{ unde } n = T1/\tau \in Z \quad \text{Ec. 6.2.}$$

$$CnB = \frac{Q2 \text{ exctr} [e^{-kdeg \cdot (T1 + T2 - n\tau)} + e^{-kdeg \cdot (T1 + T2 - 5\tau)}]}{T2 \cdot Pn} \quad \text{Ec. 6.3.}$$

$$CnC = \frac{Q3 \text{ exctr} [e^{-kdeg \cdot (T1 + 2T2 - n\tau)} + e^{-kdeg \cdot (T1 + 2T2 - 7\tau)}]}{T2 \cdot Pn} \quad \text{Ec. 6.4.}$$

$$CnD = \frac{Q4 \text{ exctr} [e^{-kdeg \cdot (T1 + 3T2 - n\tau)} + e^{-kdeg \cdot (T1 + 3T2 - 9\tau)}]}{T2 \cdot Pn} \quad \text{Ec. 6.5.}$$

$$PEC = \frac{Pn \text{ st} + (CnA)e^{-kdeg \cdot (sas - T1)} + CnB \cdot e^{-kdeg \cdot 2 \cdot T2} + CnC \cdot e^{-kdeg \cdot T2} + CnD)}{RHOsol \cdot CONV \cdot \text{Varis} \cdot DEPTH \cdot c \cdot \rho} \quad \text{Ec. 6.6.}$$

Calcularea PEC pentru curcani :

$$Q \text{ excr} = Qc \cdot Tt \cdot F \text{ exctr} \cdot \text{Manim} \cdot N \text{ ciclu anim} \quad \text{Ec. 6.7.}$$

$$CnA = \frac{Q1 \text{ exctr} \cdot e^{-kdeg \cdot (\frac{T1}{2})}}{T1 \cdot Pn} \quad \text{Ec. 6.8.}$$

$$CnB = \frac{Q2 \text{ exctr} \cdot e^{-kdeg \cdot (\frac{T2}{2})}}{T2 \cdot Pn} \quad \text{Ec. 6.9.}$$

$$CnC = \frac{Q3 \text{ exctr} \cdot e^{-kdeg \cdot (\frac{T2}{2})}}{T2 \cdot Pn} \quad \text{Ec. 6.10.}$$

$$CnD = \frac{Q4 \text{ exctr} \cdot e^{-kdeg \cdot (\frac{T2}{2})}}{T2 \cdot Pn} \quad \text{Ec. 6.11.}$$

$$PEC = \frac{Pn \text{ st} + (CnA)e^{-kdeg \cdot (sas - T1)} + CnB \cdot e^{-kdeg \cdot 2 \cdot T2} + CnC \cdot e^{-kdeg \cdot T2} + CnD)}{RHOsol \cdot CONV \cdot \text{Varis} \cdot DEPTH \cdot c \cdot \rho} \quad \text{Ec. 6.12.}$$

Calcularea PEC pentru găini ouătoare

$$Q \text{ excr} = Qc \cdot Tt \cdot F \text{ exctr} \cdot \text{Manim} \cdot N \text{ ciclu anim} \quad \text{Ec. 6.13.}$$

$$CnA = \frac{Q \text{ exctr} \cdot e^{-kdeg \cdot (\frac{T1}{2})}}{T1 \cdot Pn} \quad \text{Ec. 6.14.}$$

$$CnB = \frac{Q \text{ exctr} \cdot e^{-kdeg \cdot (\frac{T2}{2})}}{T2 \cdot Pn} = 0, (Q \text{ exctr.} = 0) \quad \text{Ec. 6.15.}$$

$$CnC = \frac{Q \text{ exctr} \cdot e^{-kdeg \cdot (\frac{T2}{2})}}{T2 \cdot Pn} = 0, (Q \text{ exctr.} = 0) \quad \text{Ec. 6.16.}$$

$$CnD = \frac{Q_{excretat} \cdot e^{-kdeg \cdot \left(\frac{T_2}{2}\right)}}{T_2 \cdot Pn} = 0, (Q_{exctr.} = 0). \quad \text{Ec. 6.17.}$$

$$PEC = \frac{Pn \cdot st \cdot (CnA \cdot e^{-kdeg \cdot (zes - T_1)})}{RHOsol \cdot CONV \cdot arie \cdot DEPTH \cdot câmp} \quad \text{Ec. 6.18.}$$

Tabel 6.1. Parametrii ecuațiilor 6.1. – 6.18.

Valori inițiale

Q c	Doza zilnică de substanța activă	mg kg ⁻¹ zi ⁻¹
T tratament	Durata tratamentului	zile

Valori date

M animal	Masa corporală medie a animalului	kg animal ⁻¹
F excrt	Fracția de substanța activă excretată	%
Np	Producția de azot pentru fermă/zi	kg ferma ⁻¹ zi ⁻¹
Np	Necesarul de azot standard în sol (EU)	kg m ⁻³
RHOsol	Densitatea solului	kg m ⁻³
	Timpul de înjumătățire a substanței active în gunoiul	
DT50gunoi	de grajd	zile
DT50sol	Timpul de înjumătățire a substanței active în sol	zile
DEPTH câmp	Adâncimea de injectare în sol	m
Conv arie factor	Factorul de conversie pentru aria terenurilor agricole	m ² ha ⁻¹
τ ciclu	Durata ciclului de viață al animalului	zile
T1	Dutara de depozitare T1	zile
T2	Durata de depozitare T2	zile

Valori

intermediare

Cicluri animal	Numărul de cicluri de viață / an	Animal an ⁻¹
	Numărul de cicluri de viață pe perioada de depozitare	
N1cicluri animal	T1 (T1/ τ ciclu)	Animal loc ⁻¹ an ⁻¹
	Numărul de cicluri de viață pe perioada de depozitare	
N2cicluri animal	T2 (T2/ τ ciclu)	Animal loc ⁻¹ an ⁻¹
Kdeg1 (gunoi grajd)	Constanta de transformare a substanței active în gunoiul de grajd	
Kdeg1 (sol)	Constanta de transformare a substanței active în sol	

Q exct.	Cantitatea de substanță activă excretată/an	mg loc ⁻¹ an ⁻¹
Q I exct.	Cantitatea de substanță activă excretată/perioada T1	
	Cantitatea de substanță activă excretată/perioada	
Q 2(3,4) exct.	T2(3,4)	
Cn205A	Concentrația în azot după prima fertilizare	mg kg ⁻¹
Cn205B	Concentrația în azot după a doua fertilizare	mg kg ⁻¹
Cn205C	Concentrația în azot după a treia fertilizare	mg kg ⁻¹
Cn205D	Concentrația în azot după a patra fertilizare	mg kg ⁻¹
Valoare finală		
PEC sol	Concentrația estimată în sol după patru fertilizări	mg kg ⁻¹ sol

Tabel 6.2. Valori inițiale pentru parametrii de intrare ai ecuațiilor 6.1-6.22.

Valori date			<i>Pui</i>	<i>Curcani</i>	<i>Găini</i>
M animal	Masa media a animalului	Kg animal ⁻¹	1	6.5	1.6
F excretată	Fracția de substanță activă excretată	%	0.85 –oxitetraclină		
			0.38 - ketoconazol		
Np	Producția de azot pentru ferma/zi	kg loc ⁻¹ zi ⁻¹	0.6		
Np _{st}	Necesarul de azot standard (EU)	kg m ⁻³	170		
RHO sol	Densitatea solului	kg m ⁻³	1500		
DT50 gunoi	Timpul de înjumătățire a substanței active în gunoiul de grajd	zile	20 – sulfametroxazol		
			30 - ketoconazol		
			50–oxitetraclină		
DT50 sol	Timpul de înjumătățire a substanței active în sol	zile	30 – sulfametroxazol		
			30 - ketoconazol		
DFPTH câmp	Adâncimea de injectare în sol	m	0.05		
	Factorul de conversie pentru aria				
Conv. arie factor	terenurilor agricole	m ² ha ⁻¹	10000		
τ ciclu	Durata ciclului de viață al animalului	zile	40	135	365
T1	Durata de depozitare T1	zile	152		
T 2	Durata de depozitare T2	Zile	71		

6.4.2. Estimarea absorbției contaminanților de către plante

Pentru a estima cantitatea de substanțe preluate de către plante din sol s-a utilizat un model de partiție în care concentrația maximă de contaminant în orice locație din plantă este determinată de echilibrul cu concentrația din apa interstitială din sol.

Valorile coeficientului de cvasi-echilibru pentru cele trei substanțe considerate au fost determinate experimental prin studiul prezentat în capitolul 5.

Factorul de cvasi- echilibriu (determinat experimental):

$$\alpha_{pt} = \frac{C_p}{C_w(f_{pw} + f_{st} + K_{oc} + f_{lip} + K_{lip})} \quad \text{Ec. 6.19.}$$

$K_{lip} \sim K_{ow}$

$\alpha_{pt} = 1$ pentru oxitetraciclina și sulfametoxazol și 0.1 pentru ketoconazol

6.4.3. Estimarea transferului contaminaților de la plantă la carne și lapte

Ingestia zilnică de contaminant a unei vaci este desigur proporțională cu cantitatea de hrană ingerată și cu gradul de contaminare al acesteia:

$$DI = \sum C_{soil} * F_{soil} + C_{pi} * F_{pi} \quad \text{Ec. 6.20.}$$

Unde: DI reprezintă cantitatea de contaminant ingerată zilnic (mg zi^{-1});

F_{soil} reprezintă cantitatea de sol ingerată zilnic (0.1 kg zi^{-1});

F_{pi} reprezintă cantitatea de vegetale ingerată zilnic (25 kg zi^{-1}).

Pentru transferul contaminanților se utilizează balanța masică și modelul difuziei contaminanților din tractul digestiv în sânge și grăsime alcătuit de McLachlan (1994).

Factorul de biotransfer:

$$\log BTF = -0.99 \log Kow^2 + 1.07 * \log Kow - 3.56 \quad \text{Ec. 6.21.}$$

($R^2=0.8259$; $F=716.31$)

Concentrația farmaceuticelor în carne și lapte:

$$C = BTF * DI * C_g \quad \text{Ec. 6.22.}$$

Unde:

BTF – factorul de biotransfer;

DI – cantitatea de contaminant ingerată zilnic (mg zi^{-1});

C_g – conținutul mediu în grăsime al cărnii respectiv al laptelui (19% și respectiv 4% - Lorber et al., 1994).

Valorile estimate obținute utilizând modelul propus în condițiile scenariilor alese se regăsesc în Tabelul 6.1.

Tabel 6.1. Valorile estimate pentru contaminarea cămii și laptelui de vacă

Contaminarea cămii și laptelui de bovină ca urmare a contaminării solului în urma fertilizării cu gunoi de grajd provenit de la ferme de păsări	Contaminare cu oxitetraciclină μg kg ⁻¹		Contaminare cu sulfamethoxazol μg kg ⁻¹		Contaminare cu ketoconazol μg kg ⁻¹	
	Carne bovine	Lapte bovine	Carne bovine	Lapte bovine	Carne bovine	Lapte bovine
Ferma pui broiler						
Administare tratament	0,0020	0,0002	0,8243	0,1221	32,4726	4,8107
- Admin. furaj medicamentat sau admin. Prelungită	0,0017	0,0002	NA	NA	NA	NA
Ferma cureani						
- Administare tratament	0,0026	0,0039	0,7872	0,1181	34,1593	5,0606
- Admin. furaj medicamentat sau admin. Prelungită	0,0043	0,0065	NA	NA	55,2996	8192
Ferma gani ouatoare						
- Administare tratament	0,00	0,000	0,0011	0,0001	0,0584	0,0096
- Admin. furaj medicamentat sau admin. Prelungită	NA	NA	NA	NA	15,0266	2,2261

6.5. Analiza sensibilității modelului

Utilitatea unui model se reflectă în corectitudinea și exactitatea datelor produse (output data). Însă, pentru că modelele reprezintă o reflectare aproximativă a realității și datele de intrare (input data) sunt rareori foarte precise, toate valorile produse sunt mai mult sau mai puțin imprecise.

Analiza sensibilității unui model studiază impactul posibilelor erori în datele de intrare asupra datelor produse. Unul din modurile de a face aceasta analiză este de a varia parametrii de intrare și de a observa cum sunt afectate datele produse.

Diagrama spider, ofera o imagine completă a relațiilor între fiecare parametru și performanțele modelului. O astfel de analiza a fost efectuată pentru a studia sensibilitatea modelului elaborat în această lucrare. (Figura 6.1.).

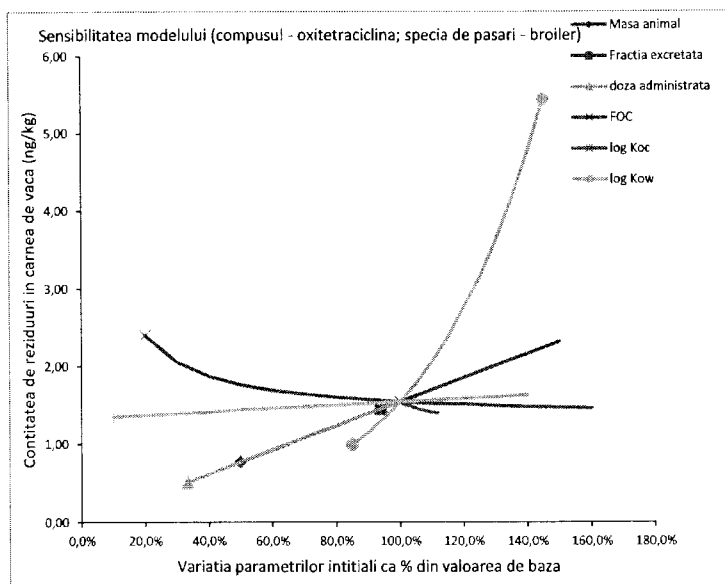


Figura 6.1. Ilustrarea sensibilității modelului elaborat (spider plot); Compusul: oxitetraciclina, specia de păsări: broileri

Variatia parametrilor s-a realizat în acest caz în limitele care reies din Tabelul 6.2.

Tabel 6.2. Variația concentrației contaminatului în carnea de vită, în cazul variației parametrilor de intrare. Modelul s-a utilizat în cazul oxitetraciclinei, specia de păsări aleasă fiind broiler

Variabile de intrare (Input)	Variabile de intrare			Variabile de intrare % bază			Date produse (output)			
	Min	Baza	Max	Min %	Baza %	Max %	Min	Baza	Maxim	Ampitudine
Masa animal	0,5	1	1,5	50,0%	100,0%	150,0%	0,77	1,54	2,32	1,55
Fractia excretata	0,8	0,85	0,9	94,0%	100,0%	106,0%	1,45	1,54	1,63	0,18
Doza administrata	10,00	30,00	30,00	33,3%	100,0%	100,0%	0,51	1,54	1,54	1,03
SOM	0,01	0,05	0,08	20,0%	100,0%	160,0%	2,40	1,54	1,46	0,94
log Koc	4,44392	4,44392	4,96999	100,0%	100,0%	112,0%	1,54	1,54	1,395	0,15
log Kow	-1,10	-0,95	-0,50	85,0%	100,0%	145,0%	0,99	1,54	5,44	4,45
α	0,10	1,00	1,00	10,0%	100,0%	100,0%	1,35	1,54	1,54	0,19
Consum hrana	15,00	25,00	35,00	60,0%	100,0%	140,0%	1,46	1,54	1,63	0,17

Din diagramele trasate pentru fiecare dintre compui selectați se observă o influență dramatică a coeficientului de partiție octanol apă log Kow în toate cele trei cazuri. De asemenea se observa odată cu creșterea log Kow și o creștere a influenței pe care o are asupra valorilor obținute fracția materiilor organice din sol (Foc sau SOM). Cu excepția Koc și log Kow, pentru restul parametrilor variația valorilor produse, respectiv a concentrației de contaminant în carne și lapte este liniară.

În concluzie modelul este sensibil în mod deosebit la variațiile log Kow și Foc, aceștia fiind parametrii cheie ai modelului.

6.6. Concluzii

Acest capitol propune un model matematic mecanicistic pentru evaluarea contaminării carni și laptelui de vacă, în cazul în care hrana acestora a absorbit antibiotice dintr-un sol contaminat. Scenariile presupun fertilizarea unei pășuni cu gunoiul provenit de la fermele de păsări. Pășunea respectivă este utilizată ca sursă de hrană pentru o turmă de vaci.

Rezultatele confirmă posibilitatea contaminării carni și laptelui de vacă cu compușii selectați.

Capitolul 7

Caracterizarea riscului alimentar de ingestie a alimentelor și apei contaminate cu reziduuri ale compușilor farmaceutici

7.2. Substanțe farmaceutice în apa potabilă

Limitele toxicologice a contaminanților farmaceutici în apa potabilă sunt considerate ca 10% din ADI sau MRL în lapte (Montfort, 2005). Se consideră un consum mediu de 2 L apă zilnic pentru o persoană cu o greutate corporală de 60 kg.

Dacă substanța farmaceutică nu e folosită și ca medicament veterinar și nu este disponibilă valoarea ADI și MRL, se calculează un ADI provizoriu din cea mai mică doză cu efect farmaceutic, utilizând un factor de siguranță de 100.

În cazul contaminanților selectați în studiul de modelare matematică vom avea:

Sulfamethoxazol

Doza orală minimă pentru om: 2 g zi⁻¹. Sulfamethoxazolul este inclus în Anexa I a Regulamentului 2377/90 ca făcând parte din clasa sulfonamidelor. ADI = 0.2 mg kg⁻¹zi⁻¹.

MRL = 100 μg kg⁻¹ lapte. MRL în lapte este bazat pe un consum de 1.5 L per zi.

Calcul: 100 μg kg⁻¹ lapte * 1.5 kg lapte persoană⁻¹ / 2 L apă persoană⁻¹.

Limita maximă de reziduuri în apa potabilă: 75 μg L⁻¹.

Oxitetracilină

Doza orală minimă pentru om: 1 g zi⁻¹. Oxitetracilina este inclusă în Anexa I a Regulamentului 2377/90. ADI = 0.03 mg/kg. MRL = 100 μg kg⁻¹ lapte (EMEA/MRL/026/95). MRL în lapte este bazat pe un consum de 1.5 L per zi.

Calcul: (100 μg L⁻¹ lapte * 1.5 kg lapte persoană⁻¹) / 2 L apă persoană⁻¹.

Limita maximă de reziduuri în apa potabilă: 75 μg L⁻¹.

Ketoconazol

Doza orală minimă pentru om: 0.2 gram per zi. Ketoconazolul nu este autorizat pentru uz veterinar. Nu exista date referitoare la doza maximă admisibilă sau MRL.

Calcul: $200 \mu\text{g L}^{-1} / 100$. Limita maximă de reziduuri în apa potabilă: $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

7.1. Doza zilnică estimată

Considerând compusul farmaceutic sulfamethoxazol, și aplicând modelul coșului zilnic, la care adaugăm contaminarea apei și vegetalelor calculul dozei zilnice estimate va fi următorul:

$$EDI = \sum(MRL_{carne} * 0,3 + MRL_{ficat} * 0,1 + MRL_{rinichi} * 0,05 + MRL_{grasime} * 0,05 + MRL_{lapte} * 1,5 + MRL_{apa} * 2 + C_{veg} * 0,5)$$

$$EDI = 357,5 \mu\text{g zi}^{-1}.$$

Fără să depășească ADI, cantitatea zilnică ingerată poate avea însă efecte pe termen lung, poate declanșa reacții alergice sau de hipersensibilitate, complicații hematologice la pacienții cu deficit de glucozo-6 fosfat-dehidrogenază, dezvoltarea rezistenței bacteriene la sulfonamide.

Trebuie adăugat însă că, studiile efectuate au raportat niveluri de contaminare a apei cu sulfamethoxazol sub $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$, cu mult mai mici decât concentrația utilizată în această estimare.

În cazul compusului ketoconazol, desi nu este exclusă o potențială expunere, această estimare nu se poate realiza întrucât pentru acest compus nu sunt fixate limite maxime de reziduuri și ADI.

CONCLUZII

Obiectivul acestei teze a fost evaluarea riscului reprezentat de prezența reziduurilor compușilor farmaceutici în alimente și apă. Abordarea acestui subiect s-a făcut prin urmărirea mai multor căi de expunere: alimentele de origine animală, apă, vegetale.

Prin dezvoltarea unei metode noi de screening HPLC–UV pentru analiza simultană a patru sulfonamide în țesut muscular de pasăre și aplicarea acesteia pe probe reale s-a demonstrat expunerea potențială a consumatorilor la reziduuri din această clasă, la un nivel ce depășește uneori limita maximă admisă.

Dezvoltarea de multimetode capabile să determine clase diferite de compuși farmaceutici, antifungice și biocide în apă, sol și material vegetal este una din cerințele actuale ale evaluării riscului de contaminare a mediului.

Metodele dezvoltate în această teză pun în evidență superioritatea tehnicilor de înaltă rezoluție Orbitrap MS, ca tehnici de screening, permițând totodată aplicarea unei metode mai puțin selective pentru prepararea probelor.

Analiza probelor reale de apă și sol a demonstrat contaminarea cu compuși farmaceutici sau antifungici la un nivel ce depășește limita admisă pentru substanțele farmaceutice de uz uman. Atât probele de apă colectate din România cât și din Olanda au arătat contaminarea cu sulfamethoxazol, diclofenac, eritromicină, carbamazepină, ketoconazol, thiabendazol, carbendazim și alte produse farmaceutice.

Solul colectat din Olanda după perioada de fertilizare a prezentat contaminare cu oxitetraciclină.

S-a investigat capacitatea plantelor de a absorbi aceste substanțe atunci când există o contaminare a solului. Experimentele au demonstrat ca pentru nivelurile de contaminare testate, plantele au această capacitate, absorția fiind dependentă de proprietățile fizico-chimice ale compușilor și de particularitățile solului.

Data fiind omniprezența compușilor farmaceutici în mediu și capacitatea plantelor de a absorbi, este necesară evaluarea expunerii consumatorilor prin contaminare indirectă.

Pentru acesta s-a evaluat prin elaborarea unui model matematic impactul contaminării solului asupra introducerii compușilor farmaceutici în lanțul alimentar. Rezultatele au demonstrat posibila contaminare cu sulfamethoxazol și ketoconazol a cărnii și laptelui de vacă în cazul în

care animalele consumă vegetale cultivate pe un sol contaminat. Modelul elaborat a fost evaluat printr-o analiză a sensibilității, evidențiindu-se parametrii relevanți.

Problematika contaminării mediului cu produse farmaceutice este foarte actuală. Identificarea compușilor farmaceutici în apă și sol, demonstrarea transferului acestor compuși la plante și în lanțul alimentar a deschis o cutie a Pandorei într-un mod pe care alte descoperiri nu au făcut-o. Aceasta pe de o parte pentru că s-a conștientizat că apa de băut, de exemplu, este în parte o apă reciclată din alte organisme. Interesul public și al mass mediei a fost prompt chiar dacă s-au măsurat concentrații ale contaminanților foarte mici.

Atunci când se evaluează riscurile la expunerea de contaminanți farmaceutici este important să se facă distincția între om și ecosisteme, atât în termenii expunerii cât și a efectelor.

Concentrații de ordinul ppt pentru ecosisteme pot duce la modificări în expresia genelor, însă pentru om consumul zilnic pe întreaga durată de viață ar oferi o expunere la compușii individuali aproximativ egală cu o singură doză terapeutică, ceea ce sugerează un pericol minor pentru sănătatea umană în general.

Evaluarea toxicității cronice în urma expunerii la amestecuri de farmaceutice nu trebuie însă neglijată. Totodată trebuie luate în considerare abordări netradiționale pentru studiile de toxicitate ca de exemplu evaluarea răspunsurilor comportamentale, de dezvoltare, de reproducere sau studii de toxicogenomică, inclusiv identificarea etapelor de viață specifice, care ar putea fi mai vulnerabile la aceste produse farmaceutice.

Ca expunere secundară, dar mai importantă decât ingestia directă, este inducerea rezistenței bacteriene la antibiotice.

Evaluarea riscurilor ar putea beneficia, de asemenea, o listă de produse farmaceutice care prezintă riscul cel mai mare, identificat pe baza unor factori specifici: modul de acțiune, doza terapeutică, expunerea mediului. Din datele disponibile se poate afirma că nu există încă nici o listă de priorități acceptată.

În concluzie, cercetările viitoare vor trebui să răspundă următoarelor întrebări:

- Care este impactul expunerii la amestecurile de contaminanți farmaceutici?
- Care sunt efectele acestei expunerii pe termen scurt și lung?
- Sunt anumite grupuri ale populației mai vulnerabile la acești compuși, ca exemplu sugarii, persoanele cu imunitatea compromisă sau cei care suferă de alergii?
- Sunt concentrațiile din sol sau apă ale acestor contaminanți suficiente pentru a provoca dezvoltarea și transmiterea rezistenței bacteriene la antibiotice?

Este totodată necesar să se ia în considerare noi metode chimice de reducere a contaminării cu produse farmaceutice a apelor uzate ca: procese de oxidare avansată cu H_2O_2 , O_3 , ClO_2 , UV, sau purificarea cu carbon activ. Prin aceste tratamente se urmărește pierderea efectului farmaceutic și creșterea capacității de biodegradare.

Contribuții originale și direcții viitoare de cercetare

În cadrul studiilor efectuate pentru elaborarea acestei teze au fost dezvoltate următoarele metode analitice:

- Metoda de determinare simultană a patru sulfonamide (sulfametoxazol, sulfaquinoxalină, sulfadiazină și sulfadimetoxină) în țesut muscular de pui, prin cromatografie în lichide cu detecție UV (HPLC-UV).
- Metoda de determinare simultană a 43 de compuși farmaceutici din clase diferite, biocide și antifungice în apă de suprafață și adâncime, utilizând cromatografia de lichide de ultra-performanță și spectrometria de masă de înaltă rezoluție (U-HPCL Exactive Orbitrap MS).
- Metoda de determinare simultană a 42 de compuși farmaceutici din clase diferite, biocide și antifungice în sol și material vegetal în stare proaspătă, utilizând cromatografia de lichide de ultra-performanță și spectrometria de masă de înaltă rezoluție (U-HPCL Exactive Orbitrap MS).

Diferitele tehnici de extracție utilizate (lichid-lichid, prin ultrasonificare sau extracția accelerată cu solvenți), purificarea și concentrarea probelor prin extracție în fază solidă au fost optimizate pentru obținerea unor randamente cât mai bune și pentru înlăturarea efectelor matricei.

Compușii analizați au fost foarte variați și au inclus clase diferite de farmaceutice și antifungice.

Studiul a demonstrat ca utilizarea tehnicilor MS de înaltă rezoluție permite separarea și identificarea unui număr foarte mare de compuși printr-un singur proces de detecție.

Conform legislației, toate rezultatele au fost confirmate prin analiză MS-MS (HPLC sau U-HPCL Triple Quadrupole MS/MS).

Toate metodele analitice prezentate în teză sunt originale și au fost validate în întregime urmând toate etapele necesare:

- Validarea prospectivă a metodei de preparare a probei, a metodei de separare și de detecție.
- Procesarea datelor reale în paralel cu probe de control pentru determinarea exactității (regăsirii).

- Validarea retrospectivă pentru evaluarea repetabilității și variabilității pe durata studiului.

Metodele dezvoltată în acest studiu pentru analiza matricelor de mediu sunt în prezent folosite pentru screeningul substanțelor farmaceutice și antifungice la Institutul de Control a Reziduurilor RIKILT-Wageningen University and Research Center, Olanda.

Studiul de absorbție a xenobioticelor de către plante a completat cercetarea în domeniu prin includerea unui compus (ketoconazolul) nestudiat până în momentul de față. Un alt element de originalitate al studiului o reprezintă compararea rezultatelor experimentale obținute cu rezultatele estimate printr-un model matematic, evidențiind relația dintre proprietățile compușilor și capacitatea de a fi absorbiți și transportați în interiorul plantelor. Studiul a luat în considerare nu numai plante destinate consumului uman, ci și consumului animal în vederea evaluării contaminării indirecte a produselor de origine animală.

A fost elaborat un model matematic pentru estimarea expunerii indirecte a consumatorilor la reziduuri farmaceutice. Modelul a adaptat ecuații existente în literatură la situații concrete, utilizând scenarii diferite.

Rezultatele obținute au permis caracterizarea riscului generat de prezența în alimente și mediu a reziduurilor compușilor farmaceutici.

Cercetările au pus în evidență faptul că reziduurile farmaceutice pot constitui o sursă de hazard în alimente, prin nerespectarea normelor de bună practică veterinară și/sau prin contaminarea mediului înconjurător.

Pe baza studiului, instituțiile abilitate ar trebui să ia măsuri cu privire la: controlul strict al reziduurilor farmaceutice în alimentele de origine animală; fixarea corectă și respectarea timpului de așteptare pentru medicamentele de uz veterinar; identificarea riscurilor pe care aceste substanțe le reprezintă pentru mediu și alcătuirea unei liste de substanțe cu risc major; monitorizarea continuă a acestor substanțe în mediul acvatic pentru o evaluare corectă a expunerii omului; elaborarea de strategii de evaluare a riscului, cu abordarea pe clase terapeutice, deoarece asemănarea structurală între medicamentele din aceeași clasă face plauzibilă anticiparea de efecte similare; organizarea de campanii de informare a publicului larg precum și noi măsuri de reglementare a emisiei acestor reziduuri în mediu.

Luând în considerare detectarea reziduurilor ca diclofenac, sulfametoxazol, carbendazim, carbamazepină, tebuconazol, thiabendazol în probele de apă de Dunăre, inclusiv în apa potabilă obținută din Dunăre, o direcție viitoare de studiu ar putea fi monitorizarea periodică a reziduurilor compușilor farmaceutici, care să conducă la o evaluare a contaminării fluviului și sedimentelor, precum și a efectelor pe care această posibilă contaminare o are asupra ecosistemelor adiacente, inclusiv impactului asupra sănătății oamenilor.

Lista de lucrări publicate sau comunicate la manifestări științifice internaționale

Articole ISI

C. L. Chițescu, E. Oosterink, J. de Jong, A. A. M. (Linda) Stolker, Accurate mass screening of pharmaceuticals and fungicides in water, by U-HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Impact factor 3.84), 2012, 403(10): 2997-3011.

C. L. Chițescu, E. Oosterink, J. de Jong, A. A. M. (Linda) Stolker, Ultrasonic or accelerated solvent extraction followed by U-HPLC-high mass accuracy MS for screening of pharmaceuticals and fungicides in soil and plant samples, *Talanta* (Impact factor 3.72), 2012, 88: 653-662.

C. L. Chițescu, A. I. Nicolau, A. Csuma, C. Moisoiu, Simultaneous analysis of four sulfonamides in chicken muscle tissue by HPLC. *Food Additives & Contaminant part A* (Impact factor 2.23), 2011, 28(8): 1013-1020.

C. L. Chițescu, A. Nicolau, A. A. M. (Linda) Stolker, Uptake of oxytetracycline, sulfamethoxazole and ketoconazole from fertilized soils by plants, 2012. *Food Additives & Contaminants part A* DOI:10.1080/19440049.2012.725479.

Articole publicate în reviste în România

C. L. Chițescu, A. I. Nicolau, Contamination of food with residues of antibiotics in the sulphonamide class, a risk can be avoided. *Medicamentul Veterinar / Veterinary Drug* Vol 4(2), 2010.

C. L. Chițescu, A. I. Nicolau, Another point of view on side effects of antifungal compounds used in veterinary medicine *Medicamentul Veterinar / Veterinary Drug*, Vol. 5 (1) 2011.

Lucrări comunicate la manifestări științifice internaționale

C. L. Chițescu, E. Oosterink, J. de Jong, A. A. M. (Linda) Stolker, Accurate mass screening of pharmaceuticals and fungicides in water, by U-HPLC Exactive Orbitrap MS, **poster** presented at *5th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis - RAFA*, Prague, Czech Republic, 1-4 November 2011.

C. L. Chițescu, A. Nicolau, A. A. M. (Linda) Stolker, Uptake of pharmaceuticals from fertilized soils by plants, **oral presentation** at *Euroresidue VII - Conferences on Residue of Veterinary Drugs in Food*, Egmond aan Zee, The Netherlands, 14-16 May 2012.

C. L. Chițescu, A. A. M. (Linda) Stolker, The use of High Resolution MS in pharmaceuticals residue screening and its application to water sample from Romanian rivers, **oral presentation** at *1st International Conference on Analytical Chemistry RO - ICAC'2012*, Târgoviste, România, 18-21 September 2012.

Referințe

- Anderson J. B., (2005). Evolution of antifungal drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nature Reviews | Microbiology*, 3, 547-556.
- Andreu V., Vazquez-Roig P., Blasco C., Picó Y., (2009). Determination of tetracycline residues in soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 394:1329–1339.
- Babić S., Ašperger D., Mutavdžić D., Horvat A. J. M., Kaštelan-Macan M., (2005). Determination of sulfonamides and trimethoprim in spiked water samples by solid-phase extraction and thin-layer chromatography. *JPC-Journal of Planar Chromatography Modern TLC*. 18: 423-426.
- Batt A. L., Aga D. S., (2005). Simultaneous Analysis of Multiple Classes of Antibiotics by Ion Trap LC/MS/MS for Assessing Surface Water and Groundwater Contamination, *Anal. Chem.* 77: 2940-2947.
- Bele C., Matea C. T., Dulf F., Miclean M., (2007). Determination of six sulfonamides in pork and beef meat by a new solid phase extraction and HPLC - UV for detection. *Bulletin USAMV-CN*, 64(1-2): 57-61.
- Bevill R.F. (2008). Sulfonamides residue in domestic animals *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 1368-2885.
- Bhanderi B. B., Yadav M. M., Roy A., (2009), Antifungal Drug Resistance - Concerns for Veterinarians, *Veterinary World*, Vol 2(5): 204-207.
- Blackwell P. A., Holten-Lützhøft H.C., Halling-Sørensen H.P., Ma, B., Boxall A. B.A., Kay P., (2004). Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography–UV detection. *Journal of Chromatography A*, 1045: 111–117.
- Blackburn S.T., (2007). *Maternal, fetal & neonatal physiology: a clinical perspective*, Saunders Elsevier.
- Boxall A. B.A., Fogg L., Blackwell P. A., Kay P., Pemberton, E. J., (2001). Review of Veterinary Medicines in the Environment, R&D Technical Report P6-012/8/TR, Environment Agency .
- Boxall A.B.A., Blankwell P., Calallo R., Kong P., Tolls J., (2002). The sorption and transport of sulphonamide antibiotics in soil systems, *Toxicol. Let.*, 131, 19-28.
- Boxall A.B.A., Johnson P., Smith E. J., Sinclair C. J., Stutt E., Levy L. S., (2006). Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 54, No. 6, 2288-2297.
- Braham R., Black W.D., Claxton J., Yee A.J., (2001). A Rapid Assay for Detecting Sulfoneamides in Tissues of Slaughtered Animals, *Journal of Food Protection*, 64: 1565-1576.
- Briggs G. G., Bromilow R. H., Evans A. A., (1982). Relationships Between Lipophilicity and Root Uptake and Translocation of Non-ionised Chemicals by Barley, *Pestic. Sci.* 13, 495-504.

Chen W.R., Huang C.H., (2009). Transformation of tetracyclines mediated by Mn(II) and Cu(II) ions in the presence of oxygen. *Environmental Science and Technology* 43, 401-407.

Chiou C.T., Sheng G., Manes M., (2001). A partition – Limited Model for the plant uptake of organic contaminant from soil and water, *Environ. Sci. Technol.*, 35, 1437-1444.

Cochrane B., Doyle E.M., Steinhart C.E., (1995). *Food Safety*, New York USA, p. 247.

Colinas C., Ingham E., Molina R., (1994). Population responses of target and non-target forest soil organisms to selected biocides, *Soil Biol. Biochem.*, 26, 41-47.

Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002 concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.. *Official Journal of the European Communities* L221, 8-36, Brussels, Belgium, 2002.

Committee on Drugs, American Academy of Pediatrics. The transfer of drugs and other chemicals into human milk. *Pediatrics*; 93:13750.

Community Reference Laboratories Residues (CRLS) 20/1/2010, Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer).

Communications, RAMIRAN.NET, Network of recycling of Agriculture, Municipal and Industrial Residues in Agriculture. www.ramiran.net/ramiran2010/.../sesions

Connors K.A., Amidon G.L., Stella V.J., (1986). *Chemical Stability of Pharmaceuticals*, John Wiley, New York.

Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decision 89/187/EEC and 91/664/EEC, *Official Journal of the European Union*, L125, 23/05/1996, pp. 10-32, Brussels, Belgium, 1996.4.

Council regulation 2377/90, Comunity procedures for the establishment of MRL of Veterinary medicinal products, for foodstuff of animal origin, *Official journal of the European Comunités* 26 June, 1990, Luxembourg.

Council Directive 93/39/EEC of 14 June 1993 amending Directives 65/65/EEC, 75/318/EEC and 75/319/EEC in respect of medicinal products, *Official Journal L 214* , 24/08/1993 p. 0022 - 0030 Luxembourg, 14 June 1993.

Council Directive 81/852/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to analytical, pharmaco-toxicological and clinical standards and protocols in respect of the testing of veterinary medicinal products, Brussels, *Official Journal L 317*, 06/11/1981 pp. 0016 – 0028, 28 September 1981.

Council Directive 2001/82/EC on the Community code relating to veterinary medicinal products, *Official Journal of the European Communities*, L 311/16 November 2001.

Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption, *Official Journal of the European Communities*, 5.12.98 Brussels, Belgium 1998.

Directive 2004/28/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/82/EC on the Community code relating to veterinary medicinal products (Text with EEA relevance), Official Journal L 136, 30/04/2004 P. 0058 - 0084, Strasbourg, 31 March 2004.

Dinga Y., Zhangb W., Gua C., Xagorarakic I., Li H., (2011). Determination of pharmaceuticals in biosolids using accelerated solvent extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1218, 10–16.

Doerge D.R., (1993). Inhibition of thyroid hormone synthesis as a mechanism for sulfonamide-induced thyroid toxicity. *The Toxicologist* 13(1), Abstract nr 144 of the 32nd annual meeting of the Society of Toxicology.

Doi A.M., Stoskopf M.K., (2000). The kinetics of oxytetracycline degradation in deionized water under varying temperature, pH, light, substrate, and organic matter. *Journal of Aquatic Animal Health* 12, 246–253.01–407.

Dolliver H., Kumar K., Gupta S., (2007). Sulfamethazine Uptake by Plants from Manure-Amended Soil, *J. Environ. Qual.* 36:1224–1230.

Dolliver H., Gupta S., Noll, S., (2008). Antibiotic degradation during manure composting. *J. Environ. Qual.* 37, 1245–1253.

Doucette W.J., (2000). Soil and sediment sorption coefficients. In Boethling R.S. and Mackay D. (Eds.), *Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals: Environmental and Health Sciences*. Lewis, Boca Raton, FL, p. 141-188.

Doucette W.J., (2003). Quantitative structure-activity relationships for predicting soil/sediment sorption coefficients for organic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1771-1788.

EEA Technical Report, 1/2010, *Pharmaceuticals in the environment*, Copenhagen.

EMA/CHPM/SWP/4477/00. Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use, London, 2006.

EMA/MRL/885/03. Committee for veterinary medicinal products, Diclofenac. Summary Report. London, 2003.

EMA/MRL/720/99. Committee for veterinary medicinal products, Eritromycin. Summary Report. London, 2002.

EMA/MRL/915/04. Committee for veterinary medicinal products, Ivormectine. Summary Report. London, 2004

EMA/MRL/592/99. Committee for veterinary medicinal products, Carazolol. Summary Report. London, 1999.

EMA/MRL/247/97. Committee for veterinary medicinal products, Albendazole. Summary Report. London, 1997.

EMA/MRL/315/97. Committee for veterinary medicinal products, Ketamine. Summary Report. London, 1997.

EMEA/MRL/767/00. Committee for veterinary medicinal products, Amprolium, Summary Report. London, 2001.

EMEA/CVMP/055/96. Note for guidance: environmental risk assessment of veterinary medical products other than GMO-containing and immunological products, European Union, EMEA, London 1996.

EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1, Revised Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products, London, 23 June 2008.

EMEA, Notice to applicants and Guideline-Veterinary medicinal products: Establishment residue limits (MRLs) for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. 2005.

European Economic Community (1992). Commission Directive 92/18/EEC of 20 March 1992 modifying the Annex to Council Directive 81/852/EEC on the approximation of the laws of Member States relating to analytical, pharmacotoxicological and clinical standards and protocols in respect of the texturing of veterinary medicinal products. Official Journal L 097:1-23.

European Community (2001a). Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products. Official Journal L 311:1-66

European Community (2001b). Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. Official Journal L 311:67-

European Community (2003). Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition (Text with EEA relevance). Official Journal L 268:29 - 43

European Economic Community (1990). Council Directive 90/676/EEC Of 13 December 1990 amending Directive 81/851/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to veterinary medicinal products. Official Journal L 373:15-25

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Evaluation of Certain Veterinary Drug Residue in Food 68th Report, Geneva 2003.

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Evaluation of Certain Veterinary Drug Residue in Food 63th Report, Geneva 1990.

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Evaluation of Certain Veterinary Drug Residue in Food 39th Report, Geneva 1997.

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Food Safety Commission. Veterinary Medicine/Food Additive, Evaluation Report of Colistin, London, 2008,

Fata-Kassinou D., Meric S., Nikolaou A., (2011). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. Anal Bioanal Chem. 399:251–275.

Furusawa N., Kishida K., (2001). High-performance chromatographic procedure for routine residue monitoring of seven sulfonamides in milk. Fresenius, J. Anal.Chem., 371: 1031-1033

Furusawa N., Kishida K., (2002). A High- performance chromatographic procedure for routine residue monitoring of seven sulphonamides in milk. *Fresenius, J. Anal. Chem.*, 1002, 371(7):1031-3.

Furusawa N., Hanabusa R., (2002). Cooking effects on sulfonamide residues in chicken thigh muscle. *Food Res. Int.* 35: 37-42.

Gerstl Z., (1990). Estimation of organic chemical sorption by soils. *J. Contaminant Hydrology* 6, 357-375.

Ghannoum M., A. L., Rice B., (1999). Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 12, No. 4: 501-517.

Gratacós-Cubarsí M., Castellari M., Valero A., García-Regueiro J.A., (2006). A simplified LC-DAD method with an RP-C12 column for routine monitoring of three sulfonamides in edible calf and pig tissue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385(7): 1218-1224.

Gobel A., Thomsen A., McArdell C.S., Alder A.C., Giger W., Theib N., Löffler D., Termes T.A., (2005). Extraction and determination of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in sewage sludge. *Journal of Chromatography A* 1085, 179-189.

Gomes E.R., Demoly P., (2005). Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Curr Opin Allerg Clin Immunol* 5:309-316.

Guidance for the Validation of Analytical Methods Used in Residue Depletion Studies VICH GL49, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug, Administration Center for Veterinary Medicine, April 9, 2010.

Guidelines for the Establishment of a Regulatory Programme for Control of Veterinary Drugs Residues in Foods (CAC/GL 16-1993).

Halko R., Padon Snaz C., Sassa F. Z., Santana R. J.J., (2006). Determination of benzimidazoles fungicides in soil samples using microwave-assisted micellar extraction and liquid chromatography with fluorescence detection, *J AOAC Int*, 89(5), 1403-1409.

Hansch C., Leo A., Hoekman D., (1995). Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. ACS Prof Ref Book. Heller SR, consult. ed., Washington, DC: Amer Chem Soc, p. 9.

Hela W., Brandtner M., Widek R., Schuh R. (2003). Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC-DAD for detection. *Food Chemistry*. 83: 601-608.

Hegelund T., Ottosson K., (2009). Effects of the antifungal imidazole ketoconazole on CYP1A and CYP3A in rainbow trout and killifish, *Environmental Toxicology and Chemistry*, DOI: 10.1897/03-155.

Hendriks A. J., Smítková Hana, Huijbregts Mark A.J., (2007). A new twist on an old regression: Transfer of chemicals to beef and milk in human and ecological risk assessment *Chemosphere* 70, 46-56.

Herklotz, P.A., Gurung, P., Heuvel, B.V., Kinney, C.A., (2010). Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere* 78, 1416–1421.

Hess D. A., Sisson M. E., Suria H., Wijsman J., Puvanesasingham R., Madrenas L., (1999). Cytotoxicity of sulfonamide reactive metabolites: apoptosis and selective toxicity of CD81 cells by the hydroxylamine of sulfamethoxazole. *The FASEB Journal*, Vol. 13.

Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K. L., (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *The Science of The Total Environment*, 225, Issues 1-2, 12, 109-118.

Hof H., (2001). Critical Annotations to the Use of Azole Antifungals for Plant Protection, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol 45, No 11: 2987–2990.

Holmberg S.D., Wells J.G., Cohen M.L., 1984. Animal-to-man transmission of antimicrobial-resistant *Salmonella*: investigations of U.S. outbreaks, 1971-1983. *JAMA*, 24:225(4664):833-51.

Hsu F.C., Kleier D.A., (1990). Phloem mobility of xenobiotics. III. Sensitivity of unified model to plant parameters and application to patented chemical hybridizing agents, *Wood Science*, 38: 315-3263.

Huang Q., Yu Y., Tang C., Peng X., (2010). Determination of commonly used azole antifungals in various waters and sewage sludge using ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217, 3481–3488.

Hung H. W., Li T. F., Chiou C. T., (2010). Partition Coefficients of Organic Contaminants with Carbohydrates, *Environ. Sci. Technol.*, 44 (14), pp 5430–5436.

Jacobsen A.M., Halling-Sørensen B., (2006). Multi-component analysis of tetracyclines, sulfonamides and tylosin in swine manure by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384, 1164–1174.

Jacobsen M., Halling-Sorensen B., Ingerslev F., Hansen S. H., (2004). Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulphonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1038, 157–170.

Jessome L. L., Volmer D.A., (2006). Ion Suppression: A Major Concern in Mass Spectrometry, *LGC North America*, 24 (5): 498–510.

Jones A.D., Bruland G.L., Agrawal S.G., Vasudevan D., (2005). Factors influencing the sorption of oxytetracycline to soils. *Environ Toxicol Chem.*, 24(4):761-70.

Jung B.S., Bark J.J., Gum M.R., Kim I. K., Park B. O., Han J. H., (2004). Simultaneous analysis of sulfonamides in beef and pork by high performance liquid chromatography and electro spray ionization mass spectrometry. *Korean J Vet Serv*, 27(1):17 - 29.

Kan C. A., Petz. M., (2000). Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 6397-6403.

Kao Y. A., Chang M. H., Cheng C. C., Chou S. S., (2001). Multiresidue determination of veterinary drugs in chicken and swine muscles by high performance liquid chromatography. *J. Food Drug Anal.* - 84-95.

- Kaufmann A., Widmer M., Maden K. (2010), Post-interface signal suppression, a phenomenon observed in a single-stage Orbitrap mass spectrometer coupled to an electrospray interfaced liquid chromatograph, *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 24: 2162–2170.
- Kelleman M., Muenster H., Zomer P., Mol H. (2009), Full scan MS in comprehensive qualitative and quantitative residue analysis in food and feed matrices: how much resolving power is required, *J Am Soc Mass Spectrom*, 20: 1464-1476.
- Kipoulou A. M., Manoli E., Samara C., (1999). Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in industrial area, *Environ Pollut*, 106, 369-380.
- Kong W.D., Zhu Y.G., Liang Y.C., Zhang J., Smith F.A., Yang M., (2007). Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Pollution* 147: 187-193.
- Korpimäki T., Brockmann E.C., Kuronen O., Saraste M., Lamminmäki U., Tuomola M. (2004). Engineering of a Broad Specificity Antibody for Simultaneous Detection of 13 Sulfonamides at the Maximum Residue Level, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (1): 40-47
- Kostich M.S, Lazorchak J.M., (2008). Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use. *Sci Total Environ* 389:329–339.
- Kumar, K., Singh, A.K., Chander, Y., Gupta, S.C., (2005a). Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Adv. Agron.* 87, 1–54.
- Kumar K., Gupta S.C., Baidoo S.K., Chander Y., Rosen C.J., (2005b). Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *J. Environ. Qual.* 34:2082–2085.
- Li H., Sheng G., Chiou C.T., Xu O., (2005). Relation of organic contaminant equilibrium sorption and kinetic uptake in plants, *Environ Sci Technol.*, 39(13):4864-70.
- Liu F., Ying G.G., Tao R., Zhao J.L., Yang J.F., Zhao L.F., (2009). Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities, *Environmental Pollution*, 157, 1636–1642.
- Lorber M., Cleverly D., Schaum J., Phillips L., Schweer G., Leighton T., (1994). Development and validation of an air-to-beef food chain model for dioxin-like compounds. *The Science of the Total Environment*. 156(1):39-65.
- El Maghraby G. M., Alomrani A. H., (2009). Synergistic Enhancement of Itraconazole Dissolution by Ternary System Formation with Pluronic F68 and Hydroxypropylmethyl cellulose, *Sci Pharm.* 77: 401–417.
- Liu F., Ying G.G., Tao R., Zhao J.L., Yang J.F., Zhao L.F., (2009). Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities, *Environmental Pollution*, 157, 1636–1642.
- Martinez-Carballo E., Gonzalez-Barreiro C., Scharf S., Gans, O., (2007). Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution* 148, 570–579.
- Martínez U.Z., (2005). Health official: clenbuterol cases rising. *Miami Herald*, Mexico Edition, 28 November 2005 (<http://www.eluniversal.com.mx/miami/15989.html>).

Maxwell R. J., Lightfield A. R., (1998). Multiresidue supercritical fluid extraction method for the recovery at low ppb levels of three sulfonamides from fortified chicken liver. *J. Chromatogr. B Biomed Sci Appl.*, 715 (2): 431 - 435.

McEvoy G.K. (ed.), (2006). American Hospital Formulary Service. AHFS Drug Information. American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD. p. 524.

McLachlan M.S.,(1994). Model of the fate of hydrophobic contaminants in cows. *Environmental Science and Technology*, 28(13):2407-2414.

McNeil J. D., Saskatchewan S., (2004). Validation Requirements for Testing for Residues of Veterinary Drugs, Joint FAO- WHO Technical Workshop on Residues of Veterinary Drugs without ADJ-MRL. - Bangkok, 24- 26 August 2004.

Montanaro A. Naisbitt D.J., Farrell J., Gordon S.F. (1998). Sulfonamide allergy. *Immuno. Allergy Clin. North Am.*, 18:843.

Montforts M.H.M.M., (2006). Validation of the exposure assessment for veterinary medicinal products, *Science of The Total Environment* Volume 358, Issues 1-3, 121-136.

Peligrad A., (2010). Price, a criterion for acquisition of more and more important in times of crises. *Meat Factory*, 7:

Pérez-Carrera E., Hansen M., León V. M., Björklund E., Krøgh K. A., Halling-Sorensen B., González-Mazo E., (2010). Multiresidue method for the determination of 32 human and veterinary pharmaceuticals in soil and sediment by pressurized-liquid extraction and LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*, 398:1173–1184.

Pfeifer T., Tuerk J., Bester K., Spiteller M., (2002). Determination of selected sulfonamides antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16 (7), 663–669.

Pico Y., Andreu V., (2007). Fluoroquinolones in soil – risk and challenges, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1287-1299. DOI:10.007/s00216-006-0843-1.

Ploum M.E., Korpimaeki T., Haasnoot W., Kohen F., (2005). Comparison of multi-sulfonamide biosensor immunoassays. *Analytica Chimica Acta*, 529(1-2):115-122.

Qiang Z., Adams C., (2004). Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics, *Water Research*, 38: 2874–2890.

Raison-Peyron N, Messaad D, Bousquet J, Demoly P., (2001). Anaphylaxis to beef in penicillin-allergic patient. *Allergy* 56:796-797.

Recommended international Code of practice for control of the use of veterinary drugs CAC/RCP 38-1993.

Rochette, F., Engelen, M., Vanden Bossche H., (2003). Antifungal agents of use in animal health – practical applications, *J. vet. Pharmacol. Therap.* 26:31–53.

Vaclavik E., B. Halling-Sorensen, F. Ingerslev, (2004). Evaluation of manometric respiration tests to assess the effects of veterinary antibiotics in soil, *Chemosphere*, 56:667-676.

- Rabølle M., Sqliid N.H., (2006). Sorption and mobility of metronidazole, aloquidox, oxytetracycline and tylosin in soil, *Chemosphere*, 40, 715-722.
- Rosenbaum R. K., Mc. Kone T., Jollie O. (2009), Ckow: a dynamic model for chemical transfer to meat and milk. *Environ. Sci. Technol.* 43, 8191–8198.
- Rutgers M., Mulder C., Schouten A.J., (2008). Soil ecosystem profiling in the Netherlands with ten references for biological soil quality, RIVM rapport 607604009.
- Saleh N. Md., Sanagi M., (2009). Comparison of PLE with Soxhlet extraction in the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons soil, *The Malaysian Journal of Analytical Science*, 13(1), 141-145.
- Sangster J., (1997). Octanol - Water Partition Coefficient Fundamentals and Physical Chemistry, John Willei&Suns Ltd, England.
- Schowaneck D., Webb S. (2002), Exposure simulation for pharmaceuticals in European surface waters with GREAT-ER, *Toxicology Letters* 131:39–50.
- Simmons J.E., Richardson S.D., Teuschler L.K., Miltner R.J., Speth T.F., Schenk K.M., et al. (2008). Research issues underlying the four-lab study: Integrated disinfection by-products mixtures research. *J Toxicol Environ Health* 71:1125–1132.
- Slatore C. G., Tilles S. A., (2004). Sulfonamide hypersensitivity. *Immuno. Allergy Clin. of North Am.* – Vol. 24, Issue 3 (August).
- Stoev, G., Michailova, A., (2000). Quantitative determination of sulfonamide residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* 871:37-42.
- Stolker A.A.M., Brinkman U.A.Th, (2005). Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review, *Journal of Chromatography A*, 1067:15–53.
- Stolker A.A., Niesing W., Hogendoorn E.A., Versteegh J.F., Fuchs R., Brinkman U.A., (2004). Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water, *Anal Bioanal Chem.*, 378(4):955-63.
- Stolker A.A.M (2008), Application of UPLC/TOF for residue analysis of veterinary drug and growth-promoting agents in product of animal origin, *Liquid Chromatography Time of Flight Mass Spectrometry. Principle, Tools, and Applications for Accurate Mass Analysis*, Volume 173 (eds I. Ferrer and E. M. Thurman), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
doi: 10.1002/9780470429969.ch12
- Sukul, P., Spiteller, M., (2006). Sulfonamides in the environment as veterinary drugs. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 187, 67–101.
- Tadeo J. L., Sánchez-Brunete C., Albero B., García-Valcárcel A. I., (2010). Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples, *Journal of Chromatography A*, 1217, 2415–2440S.
- Teira-Esmatges M.R, Babot D., Boixadera J. García-Ventosa P., (2010). Generated amount and composition of pig slurry and poultry manure: a field study. Use of manures and organic wastes to

improve soil quality and nutrient balances. Oral Communications, RAMIRAN.NET, Network of recycling of Agricultures, Municipal and Industrial Residues in Agriculture. www.ramiran.net/ramiran2010/.../sesions.

Thiele-Bruhn S., (2003). Pharmaceutical antibiotic compounds in soil – a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 166, 145-167.

Travis, C.C., and Arms A.D., (1988). Bioconcentration of organics in beef, milk, and vegetation. *Environmental Science and Technology*. 22(3):271-274.

Tolls J. (2001). Sorption of veterinary medicines: a review. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 3397-3406.

Thomas G.K., Millar R.G., Anstis P.W., (1997). Stability of sulfonamide antibiotics in spiked pig liver tissue during frozen storage. *J AOAC Int.*, 80(5):988-995.

TOXNET 2005. Hazardous Substance Data Bank (HSDB). On line scientific Search Engine. National Library of medicine, National Institute of Health, <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>.

Trapp S., (2000). Modelling uptake into roots and subsequent translocation of neutral and ionisable organic compounds. *Pest Manage. Sci.*, 56, 767–778.

U.S. Environmental Protection Agency, Methodology for Predicting Cattle Biotransfer Factors. September 23, 2005.

Vazquez-Roi P., Andreu V., Onghena M., Blasco C., Picó Y., (2011). Assessment of the occurrence and distribution of pharmaceuticals in a Mediterranean wetland (L'Albufera, Valencia, Spain) by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*, 400:1287–1301, DOI 10.1007/s00216-011-4826-5.

Verdel, B.M. Souverein, P.C. Egberts, A.C.G. Leufkens, H.G.M. (2004). Difference in Risk of Allergic Reaction of Sulfonamide Drugs based on Chemical Structure. *The Annals of Pharmacotherapy*.

Verweij P. E., Snelders E., Kema G., H. Mellado E. (2009). Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side effect of environmental fungicide use?. *Lancet Infect Dis*, 9:789-95.

Yuan S., Wang Q., Yates S. R., Peterson N. G. (2010). Development of an efficient extraction method for oxytetracycline in animal manure for high performance liquid chromatography analysis. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 45, 612–620.

Zhang, H., Wang, L., Zhang, Y., Fang, G., Zheng, W., Wang, S., (2007). Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Seven Sulfonamide Residues and Investigation of Matrix Effects from Different Food Samples. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (6):2079–2084.

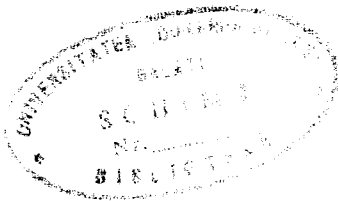
Zarn J., A., Brüscheweiler B. J., Schlatter J. R. (2003). Azole Fungicides Affect Mammalian Steroidogenesis by Inhibiting Sterol 14 α -Demethylase and Aromatase. *Environmental Health Perspectives*, 111(3): 255-261.

Zwiener C. (2007). Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment. *Anal Bioanal Chem* 387:1159–1162

Zhang, S., Zhang, H. Y., Wang, L., Duan, Z. J., Kennedy, I. (2006). Analysis of sulphonamides residues in edible animal products: A review. *Year 4*, 2, 2010.

Winker M., (2009). Pharmaceutical residue in urine and potential risk related to usage as fertiliser in agriculture. PhD Thesis. Hamburg University of Technology.

Wu C., Spongberg A., Witter J., Fang M., Czajkowski K. P., (2010). Uptake of Pharmaceutical and Personal Care Products by Soybean Plants from Soils Applied with Biosolids and Irrigated with Contaminated Water. Environ. Sci. Technol. 44, 6157-6161.



7,00