



UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI
FACULTATEA DE INGINERIA SISTEMELOR BIOTEHNICE
ȘCOALA DOCTORALĂ: INGINERIA SISTEMELOR BIOTEHNICE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**CERCETĂRI PRIVIND REALIZAREA UNEI METODE
DE EVALUARE A IMPACTULUI ASUPRA MEDIULUI A
PRODUSELOR MEDICINALE VETERINARE**

Conducător doctorat:

Prof.univ.dr.ing. Carmen-Otilia Rusănescu

Doctorand:

Ing. Chim. Loghin (Ciuca) Viviana Carmen

2023

CUPRINS

INTRODUCERE	4
Scopul și obiectivele tezei de doctorat.....	5
Structura tezei de doctorat	5
CAPITOLUL 1. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII PRIVIND EVALUAREA IMPACTULUI ASUPRA MEDIULUI A MEDICAMENTELOR VETERINARE	7
1.1. Legislația europeană privind evaluarea impactului asupra mediului a medicamentelor veterinare.....	7
1.2. Evaluarea impactului asupra mediului a medicamentelor veterinare	8
1.3. Stadiul actual al cercetării privind evaluarea impactului asupra mediului a medicamentelor veterinare.....	15
CAPITOLUL 2. CERCETĂRI PROPRII DE EVALUARE A RISCULUI DE MEDIU PENTRU ANTIBIOTICE VETERINARE	23
2.1. Medicamente veterinare analizate.....	23
2.2. Evaluarea analitică a riscului de mediu pentru levamisol.....	24
2.3. Evaluarea analitică a riscului de mediu pentru tiamulin.....	26
2.4. Evaluarea analitică a riscului de mediu pentru florfenicol.....	29
2.5. Evaluarea analitică a riscului de mediu pentru lincomicină și spectinomycină.....	36
2.6. Diseminarea cercetărilor de evaluare a impactului asupra mediului al medicamentelor veterinare.....	40
CAPITOLUL 3. ALGORITMI DE CALCUL ÎN ANALIZA RISCULUI DE MEDIU	41
3.1. Algoritm general de calcul.....	41
3.2. Algoritm concentrațiilor predictibile în apă, sol, sediment.....	42
3.3. Algoritm concentrațiilor predictibile fără efect.....	45
3.4. Algoritm pentru determinarea riscului inițial.....	48
3.5. Algoritm concentrațiilor predictibile rafinate.....	50
3.6. Algoritm pentru determinarea riscului rafinat.....	56
CAPITOLUL 4. METODA SOFTWARE ÎN ANALIZA RISCULUI DE MEDIU	59
4.1. Descrierea metodei software.....	59
4.2. Evaluarea rapidă a riscului de mediu pentru amprolium.....	59
4.2.1. Evaluarea analitică a riscului de mediu pentru amprolium.....	60
4.2.2. Evaluarea riscului de mediu pentru amprolium prin metoda software.....	62
4.3. Evaluarea rapidă a riscului de mediu pentru penicilina G.....	68
4.3.1. Evaluarea analitică a riscului de mediu pentru penicilina G.....	68
4.3.2. Evaluarea riscului de mediu pentru penicilina G prin metoda software.....	70
CAPITOLUL 5. MONITORIZAREA PENICILINEI G DIN APELE DE SUPRAFAȚĂ prin SPE- online-UHPLC-MS/MS	74
5.1. Prelevarea și pregătirea probelor de apă.....	74
5.2. Echipamente, reagenți.....	74

5.3. Descrierea metodei SPE-online-UHPLC-MS/MS.....	75
5.4. Rezultate și discuții.....	76
CAPITOLUL 6. MONITORIZAREA TRIMETOPRIMULUI DIN APELE DE SUPRAFAȚĂ prin SPE-online-UHPLC-MS/MS.....	83
6.1. Prelevarea și pregătirea probelor de apă	83
6.2. Echipamente, reagenți	83
6.3. Descrierea metodei SPE-online-UHPLC-MS/MS	84
6.4. Rezultate și discuții.....	84
CAPITOLUL 7. CONCLUZII GENERALE CONTRIBUȚII ORIGINALE ȘI PERSPECTIVE.....	88
7.1. Concluzii generale.....	88
7.2. Contribuții originale.....	90
7.3. Perspective.....	91
BIBLIOGRAFIE	92
ABREVIERI.....	106
ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ.....	108
ANEXA 1. Software pentru evaluarea impactului asupra mediului a unui produs medicinal veterinar cu ingredientul activ AMPROLIUM.....	114
ANEXA 2. Software pentru evaluarea impactului asupra mediului a unui produs medicinal veterinar cu ingredientul activ PENICILINA G.....	181

* Cuprinsul respectă paginația din teza de doctorat. De asemenea, numerele figurilor și tabelelelor din prezentul rezumat corespund celor din teza de doctorat.

CUVINTE CHEIE

Evaluarea riscului de mediu, medicamente veterinare, metodă software de evaluare a riscului de mediu, monitorizarea antibioticelor din apele de suprafață, metoda SPE-online-UHPLC-MS/MS.

INTRODUCERE

Extinderea continuă a populației umane a condus la o proliferare a cantității și diversității produselor medicinale veterinare consumate și ulterior excretate în mediu.

În acest studiu de doctorat, compușii de interes sunt antibioticele, ingrediente active din medicamentele de uz veterinar care au devenit o componentă integrantă în menținerea sănătății animalelor dar în același timp, și o mare îngrijorare din cauza efectelor potențiale asupra mediului. Prevenirea rezistenței la antimicrobiene, o preocupare în creștere pentru sănătatea publică, necesită un control riguros al consumului acestora, monitorizarea reziduurilor, evoluția și eliminarea din mediul înconjurător [1-9].

În evaluările riscului de mediu ale produselor farmaceutice veterinare, cerute de U.S. Food and Drug Administration (FDA) din 1980 și în Uniunea Europeană din 1997, sunt analizate efectele medicamentelor veterinare asupra mediului. Rezultatele studiilor efectuate în aceste evaluări sunt accesibile în numeroase publicații și oferă informații cu privire la impactul medicamentelor de uz veterinar asupra mediului înconjurător [10-13]. Toate evaluările prezentate în această teză ajută la înțelegerea riscului ecologic potențial al acestor medicamente veterinare pentru a dezvolta strategii de management în vederea reducerii acestora în mediu. Antibioticele nu sunt reglementate prin standardele europene actuale de calitate a apei, ceea ce necesită dovezi privind contaminarea lor pe scară largă a mediului. Rezultatele acestor studii oferă informații privind reziduurile prezente în sol, apă, sediment și riscul de mediu al substanțelor individuale față de organisme țintă și non-țintă. [14-19].

Importanța majoră pe care o prezintă studiile de evaluare a impactului asupra mediului a produselor medicinale veterinare în vederea obținerii autorizației pentru comercializarea lor, a constituit unul din motivele alegerii temei prezentei teze de doctorat. Al doilea argument care a motivat alegerea temei, este de a veni în sprijinul evaluatorilor prin crearea unei metode software care să le permită efectuarea unor analize de evaluare a riscului de mediu deosebit de minuțioase în perioade extrem de reduse de timp. Tematica tezei de doctorat este în concordanță cu preocuparea continuă a Uniunii Europene pentru creșterea calității vieții prin reducerea poluării. Evaluările de risc de mediu au fost efectuate în conformitate cu descripțiile și recomandările ghidului Agenției Europene a Medicamentului (EMA).

Poluanții țintă ai prezentei teze de doctorat sunt medicamentele veterinare analizate:

- LEVASOL 10%, soluție orală pentru bovine, ovine, caprine, suine și păsări care conține 100 mg/ml levamisol clorhidrat.
- TIASOL 10% - soluție orală, indicat la suine, iepuri și păsări (găini, pui broileri, curci, porumbei, fazani, bibilici) care conține 100mg/ml tiamulin hidrogen fumarat.
- FLORFENICOL FP 10% - soluție orală pentru gaini (broileri, tineret înlocuire) și suine care conține 100 mg/ml florfenicol.
- LIN – SPE – MIX 880 - pulbere hidrosolubilă pentru suine și pui de găina care conține 293mg/g lincomicina, și 293mg/g spectinomycină.
- AMPROLIUM FP 25% premix pentru broileri, găini, curcani, care conține 250 mg/g amprolium.
- BENZILPENICILINA POTASICA PASTEUR 25% - pulbere orală pentru porci, pui de găina, pui de carne și curcani care conține 250mg/g benzilpenicilină potasică (Penicilina G).

Scopul și obiectivele tezei de doctorat

Prin acest studiu de doctorat s-a urmărit aducerea de contribuții privind elaborarea de evaluări pentru determinarea riscului de mediu ale produselor medicinale veterinare. În cadrul tezei de doctorat a fost elaborată o procedură care a avut drept scop determinarea conținutului de antibiotice din probe de apă

de suprafață utilizând tehnica SPE-online-UHPLC-MS/MS. Obiectivul principal al acestei teze de doctorat este reprezentat de dezvoltarea și aplicarea unei metodologii noi pentru a evalua riscul de mediu al produselor medicinale veterinare, metodă software de analiză creată pe baza unui algoritm propriu. Pentru atingerea acestui obiectiv, au fost dezvoltate trei direcții principale de cercetare, după cum urmează:

1. Studii privind evaluarea riscului de mediu a medicamentelor veterinare LEVASOL 10%, TIASOL 10%, FLORFENICOL FP 10% și LIN – SPE – MIX 880, pe baza unei metode analitice de analiză conform prevederilor ghidului EMEA.

2. Studii privind evaluarea riscului de mediu a medicamentelor veterinare BENZILPENICILINA POTASICA PASTEUR 25% și AMPROLIUM FP 25% pe baza unei metode software de analiză creată pe baza unui algoritm propriu care respectă prevederilor ghidului EMEA.

3. Studii privind elaborarea unor proceduri care au avut drept scop determinarea conținutului de antibiotice din probe de apă de suprafață (penicilina G și trimethoprim), utilizând tehnica SPE-online-UHPLC-MS/MS.

Structura tezei de doctorat

Teza de doctorat este structurată pe 7 capitole.

Introducerea prezintă aspectele referitoare la impactul produselor medicinale veterinare asupra mediului și necesitatea evaluării riscului de mediu. În această secțiune sunt prezentate obiectivul principal al tezei, direcțiile urmate pentru atingerea acestui obiectiv și activitățile de cercetare.

Capitolul 1 prezintă procedura de evaluare a impactului asupra mediului a medicamentelor veterinare conform legislației europene și o sinteză privind stadiul actual al cercetării privind evaluarea impactului produselor medicinale veterinare asupra mediului.

Capitolul 2 descrie în detaliu cercetări proprii de evaluare a riscului de mediu pentru 4 antibiotice veterinare, care au fost aplicate în acest studiu pentru a evalua cerința de siguranță a medicamentelor veterinare care conțin aceste antibiotice.

Capitolele 3 și 4 prezintă contribuțiile originale ale acestei teze de doctorat ce constau în elaborarea unei metode software pentru analiza riscului de mediu creată pe baza unui algoritm propriu de calcul și avantajele aplicării acestei metode.

Capitolele 5 și 6 descrie elaborarea unei proceduri care a avut drept scop determinarea conținutului de antibiotice din probe de apă de suprafață și apă reziduală, utilizând tehnica SPE-online-UHPLC-MS/MS și prezintă rezultatele monitorizării penicilinei G, trimetoprimului din apele de suprafață prin SPE-online-UHPLC-MS/MS.

Ultimul capitol prezintă **Concluziile generale** ale acestui studiu, urmate de prezentarea referințelor utilizate în elaborarea tezei de doctorat, lista cu lucrările publicate în reviste de specialitate internaționale cotate ISI și lista cu lucrări prezentate la conferințe naționale și internaționale.

Rezultatele obținute în urma cercetărilor realizate în cadrul studiului de doctorat au fost comunicate la manifestări științifice și de asemenea publicate/acceptate/trimise spre publicare în reviste de specialitate (**Activitate științifică**).

ACKNOWLEDGEMENT

Rezultatele prezentate în această teză de doctorat au fost obținute cu sprijinul financiar al: Acordul de finanțare cu titlul "Formarea doctoranzilor și cercetătorilor postdoctorali în vederea dobândirii de competențe de cercetare aplicată - SMART", contract nr.13530/16.06.2022 - cod SMIS: 153734

CAPITOLUL 1.

STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII PRIVIND EVALUAREA IMPACTULUI ASUPRA MEDIULUI A MEDICAMENTELOR VETERINARE

1.1. Legislația europeană privind evaluarea impactului asupra mediului a medicamentelor veterinare

Cercetările privind evaluarea riscului de mediu (ERA) au ca scop identificarea riscurilor pentru mediu precum și necesitatea unor măsuri specifice de minimizare a riscurilor.

ERA are în vedere administrarea medicamentului, proprietățile fizico-chimice și ecotoxicologice ale substanțelor sale active. Rezultatul ERA este rezumat în raportul de evaluare al Comitetului pentru produse medicamentoase de uz veterinar (CVMP) și este disponibil în Raportul public european de evaluare (EPAR) al medicamentului.

VICH este un program trilateral (UE-Japonia-SUA) care vizează armonizarea cerințelor tehnice pentru înregistrarea produselor de uz veterinar (Veterinary International Conference on Harmonization). În UE, orientările științifice și reglementările privind ERA sunt elaborate și adoptate de (CVMP) al Agenției Europene pentru Medicamente (EMA), cu sprijinul experților de la Grupul de lucru pentru evaluarea riscurilor de mediu (ERAWP) al CVMP. Înainte de aprobarea sa de către Comitet, orice proiect de ghid este publicat pentru consultare, pentru a permite părților interesate să ofere contribuții.

Evaluarea riscului asupra mediului este o investigație complexă a expunerii factorilor de mediu la substanțele active dintr-un produs medicinal veterinar și a efectelor adverse rezultate. Ghidul EMA/CVMP/ERA/418282/2005 structurat în două faze de evaluare, Faza I (VICH GL6) și Faza II (VICH GL38) stă la baza unei evaluări de risc de mediu. Cerințele de evaluare a riscului pentru mediu în funcție de tipul de procedură, sunt incluse în ghidul EMA/CVMP/182112/2006 aprobat în 2009. Aceste documente de orientare au fost elaborate de VICH pentru a armoniza cerințele de date și procesul de evaluare a riscurilor de bază pentru aprobarea, autorizarea produselor medicamentoase veterinare în țările participante. Regulamentul (UE) 2019/6 din ianuarie 2022, urmărește actualizarea cadrului de reglementare pentru produsele medicinale veterinare și înlocuiește Directiva 2001/82/CE.

Conform noului regulament, Comisia are la dispoziție 3 ani de la data intrării în vigoare (ianuarie 2025) pentru a studia fezabilitatea transferării evaluării riscurilor de mediu de la o abordare bazată pe produse la o abordare bazată pe substanțe. Evaluarea riscului bazată pe substanțe ar fi axată pe dezvoltarea monografiilor cuprinzătoare ale substanței active la care pot face referire solicitantii de produse noi sau generice atunci când pregătesc cererea de autorizare a produsului și faptul că nu ar fi nevoie să se relice studii care există deja, ar conduce la evaluări de risc armonizate și robuste, oferind o caracterizare mai cuprinzătoare a riscurilor.

Micșorarea riscului este o parte esențială a evaluării produselor și poate fi utilizată pentru a restricționa riscul asociat cu un produs la un nivel acceptabil, sau chiar de a înlătura complet un astfel de risc. În principiu, aplicantul trebuie să propună măsuri de micșorare a riscului, și, dacă este cazul, eficacitatea unor astfel de măsuri trebuie să fie dovedită de datele din dosar.

Documentul de orientare tehnică al Agenției Europene pentru Produse Chimice (ECHA), "Technical Guidance Document supports legislation on assessment of risks of chemical substances to human health and the environment" (TGD) sprijină legislația privind evaluarea riscurilor substanțelor chimice pentru sănătatea umană și pentru mediu și include noi abordări în evaluarea riscului produselor medicinale veterinare (Directive 93/67/EEC privind evaluarea riscurilor pentru noile substanțe notificate, Regulation (EC) No 1488/94 privind evaluarea riscurilor pentru substanțele existente, Directive 98/8/EC al Parlamentului European și al Consiliului privind introducerea pe piață a produselor biocide).

Ghidul național privind utilizarea prudentă a antimicrobienelelor în medicina veterinară actualizat în februarie 2020, întocmit în baza legislației sanitare veterinare în vigoare, oferă informații utile în evaluarea antibioticelor veterinare [20-24].

1.2. Evaluarea impactului asupra mediului a medicamentelor veterinare

Analiza impactului asupra mediului este o evaluare a posibilelor pericole pentru mediu prezentate de un medicament veterinar.

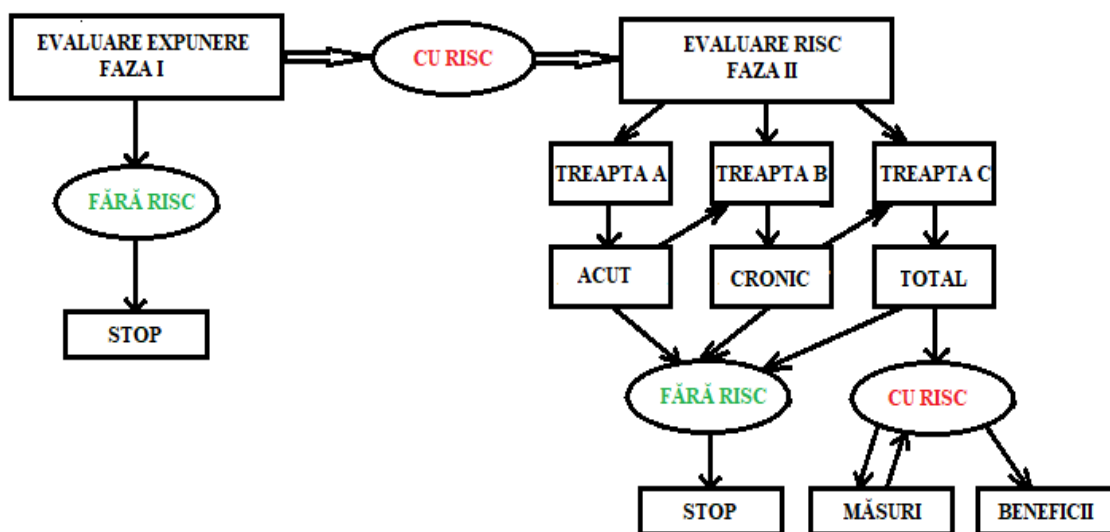


Figura 1.1. Evaluarea riscului de mediu pentru medicamentele veterinare în UE

Agenția Europeană pentru Medicamente (EMA) ia în considerare riscurile de mediu ale unui medicament veterinar în evaluarea beneficiului/risc și oferă îndrumări pentru a ajuta solicitantii de autorizație de introducere pe piață să evalueze impactul asupra mediului al medicamentului lor și să pună în aplicare măsuri de atenuare a riscurilor (Figura 1.1).

Analiza riscului asupra mediului a PMV efectuată conform tuturor prevederilor din ghidul EMA, asigură predictibilitatea și transparența rezultatelor obținute. Factorii determinanți pentru concentrația expunerii finale sunt calea de distribuție și evoluția în mediu. Etapele unei evaluări de mediu sunt: analiza expunerii mediului (sol, apă freatică, ape de suprafață și sediment) la substanța activă din produsul medicinal veterinar analizat, evaluarea efectelor produse și caracterizarea riscului final.

Concentrația predictibilă a substanței active în mediu (PEC) se determină conform formulei de calcul indicată în ghid cunoscând indicația de utilizare a PMV, proprietățile fizico-chimice și date cu privire la eliberarea substanței active în mediu.

Concentrația predictibilă fără efect (PNEC) se determină prin raportarea datelor despre descriptorii ecotoxicologici disponibili la un factor de evaluare corespunzător (FA).

Faza I aplică abordarea rezidului total. Acest lucru înseamnă că întreaga cantitate de substanțe active din doza aplicată este excretată de animal și datele referitoare la metabolism nu trebuie luate în considerare.

Speciile de interes economic pot fi crescute în interior (ferme) sau pot fi ținute afară (pășune). În ghidul VICH cele dintâi sunt considerate a fi animalele crescute intensiv și cele din urmă animalele crescute pe pășune. Animalele crescute intensiv sunt acelea care sunt crescute în interior, de-a lungul ciclului de producție, astfel încât tratamentul cu produsul medicinal veterinar este realizat în interior și substanța activă reziduală este eliminată în locul de creștere și este încorporat în dejecții. Acest reziduu activ ajunge în mediu atunci când dejecțiile sunt împrăștiate pe terenuri agricole și fânețe. În cazul animalelor de pășune tratamentul cu PMV este realizat pe teren și reziduu de substanță activă provenită din PVM este eliminat direct în sol. Calcularea concentrației de substanțe active (PEC_{sol}pășune) pentru animalele de pășune se face conform prevederilor ghidului EMA luând în considerare numărul de animale ținute pe teren, (densitate de stocare) și valorile disponibile în ghid, funcție de specie.

Calculul concentrației predictibile de substanță activă în sol (PEC_{sol}) provenită din PVM, se face luând în considerare reziduu total de substanță activă, fără a se ține seama de metabolism. În calcularea PEC_{sol} se ia în considerare proporția de animale tratate, din turmă, care este disponibilă în documentația tehnică a produsului, în urma experimentului de teren sau în literatura științifică. Atunci când asemenea informații specifice nu sunt disponibile, trebuie utilizate valorile date în ghidul EMA pentru diferite grupuri de produse medicinale veterinare, valori care au fost stabilite după discuții cu medicii veterinari din Statele Membre ale Uniunii Europene (UE). Date cu privire la numărul de animale crescute, greutatea corporală, azotul produs și factorul de creștere care intră în calculul PEC sol inițial sunt disponibile în ghidul EMA.

În ghidul VICH este menționat faptul că produsele medicinale veterinare administrate animalelor crescute intensiv au potențialul de a afecta speciile non-țintă din apele de suprafață indirect datorită transportului ingredientului activ în apă, fie în apa de suprafață, fie în apa freatică atunci când este absorbit în sol. Transportul în apa de suprafață poate avea loc fie prin deversare fie prin scurgere. Medicamentele veterinare sunt emise în mediu și transferul în apele subterane și de suprafață este difuz și complex, în timp ce informațiile reale despre comportamentul acestora sunt frecvent limitate. Căile de expunere a mediului pentru produsele medicinale veterinare sunt prezentate în Figura 1.5.

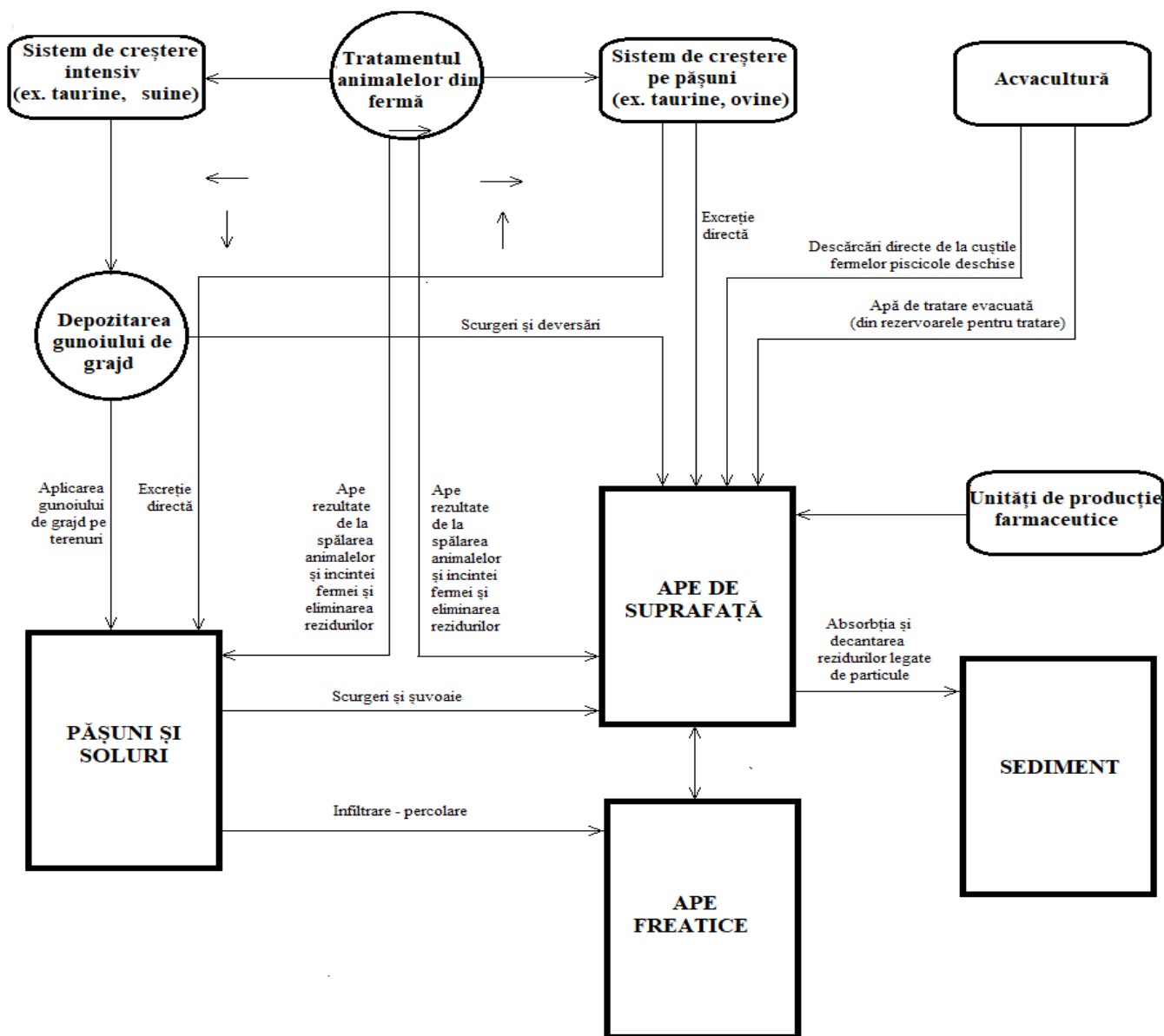


Figura 1.5 Căi de expunere a mediului pentru produsele medicinale veterinare

Este de asemenea posibil ca ingredientul activ să ajungă în apa freatică cu potențialul de a cauza efecte adverse asupra rețelelor de apă potabilă. De aceea, este necesar să se calculeze valorile concentrațiilor predictibile atât pentru apa de suprafață cât și pentru cea freatică. Este recomandat ca atunci când se calculează valorile PEC pentru apa freatică și pentru cea de suprafață să fie urmată o abordare treptată, utilizând ecuații simple pentru o analiză inițială standard și de a trece mai departe la o abordare mai complexă atunci când este necesară o estimare rafinată a expunerii.

Calculul concentrației de substanță activă reziduală în apele freatică (PEC_{apă freatică}) se face conform principiului echilibrului de sorbție în solide, prin intermediul coeficientului de distribuție apă-carbon organic (K_{oc}).

Pentru determinarea concentrației predictibile de substanța activă reziduală în apele de suprafață (PECapă de suprafață), ghidul indică 1/3 din concentrația în apele freatice.

Concentrația predictibilă de substanță activă reziduală în sediment (PEC sediment) se determină luând în considerare coeficientul de partiție sediment-apa (Ksed-apa).

Abordarea (echilibrul de sorbție în solide) pentru calculul PECapă freatică este descrisă în Technical Guidance Document on Risk Assessment (TGD) [23].

Valoarea PECapă de suprafață calculată trebuie comparată cu valorile PNEC pentru fiecare specie acvatică testată. Dacă valorile riscului (R) pentru orice nivel trofic sunt mai mari decât 1, atunci PEC poate fi rafinat pe baza datelor referitoare la metabolism. Dacă $R > 1$ se menține, pot fi utilizate modele mai sofisticate pentru a estima PECapă de suprafață inițial (Projects FOCUS DG SANTE). Dacă în continuare $R > 1$, sunt necesare date referitoare la toxicitatea cronică pentru a perfecționa PNEC-ul. Acest PNEC trebuie comparat mai apoi cu nivelurile cronice de expunere.

Datele cu privire la concentrația unei substanțe în orice mediu sub care efectele adverse nu se vor produce, (concentrația efectivă EC50, concentrația medie letală LC50, concentrația fără efecte observate NOEC) sunt disponibile în funcție de durata expunerii, pe termen lung sau pe termen scurt.

PNEC-urile sunt determinate luând în considerare datele cu privire la parametrii de ecotoxicitate și factorii de evaluare (FA) corespunzători. Factorii de evaluare aplicați în calculul PNEC, reglează diferențele dintre datele obținute în laborator și în mediul natural și au valori mai mici pentru testele de toxicitate pe termen lung deoarece incertitudinea lor este mică. Cu cât avem disponibile mai multe date despre toxicitate din același compartiment de mediu factorii de evaluare au valori mai mici.

Pentru determinarea riscului de mediu se utilizează PNEC-ul determinat pe baza celui mai sensibil rezultat toxic pentru o anumită specie.

Stabilirea concentrației PNEC în sol și sediment se face pe baza datelor de toxicitate disponibile sau cu metoda echilibrului partițiilor având un PNECapă calculat pe baza datelor de toxicitate și factorului de evaluare [25].

$$PNEC_{sol} = (0,1176 + 0,01764 \times K_{oc}) \times PNEC_{capa} \quad (1.1)$$

$$PNEC_{sediment} = (0,783 + 0,0217 \times K_{oc}) \times PNEC_{capa} \quad (1.2)$$

Pentru a determina riscul pentru compartimentele de mediu (sol, apă, sediment) al unei substanței active, se raportează valorile concentrației predictibile de mediu (PEC) la valorile concentrației predictibile fără efect (PNEC) și în concordanță cu prevederile ghidului EMEA, dacă $PEC / PNEC < 1$, riscul este acceptabil.

În **Faza I**, se parcurge schema arborelui decizional care conține 17 întrebări privind substanțele active ale produsului analizat, speciile țintă, potențiala expunere la mediu, luând în considerare, caracteristicile fizico chimice ale ingredientelor componente și modul de administrare a produsului medicinal veterinar. Se calculează concentrația predictibilă inițială de substanțe active care au pătruns în sol (PECsol), în apă (PECapă) și în sediment (PECsediment).

Pentru calcularea PECsol, sunt necesari parametrii disponibili din specificația tehnică a produsului.

Dacă valorile concentrațiilor predictibile în sol ($PEC_{sol\ initial}$) pentru o specie tinta sunt mai mari de **100 μg/kg**, evaluarea riscului pentru mediu trebuie să continue în faza II pentru toate ingredientele active, utilizând cea mai nefavorabilă valoare a concentrației predictibile în sol.

În **Faza II**, se vor analiza proprietățile fizice/chimice, farmacologice și toxicologice ale substanțelor active, evoluția și stabilitatea în sol, apă și excremente, efectele asupra organismelor non țintă. În faza II, treapta A, sunt prezentate un set de date referitoare la evoluția și efectele substanțelor active în mediu, date foarte importante, ce permit cunoașterea pericolelor și posibilitatea de a interveni în micșorarea riscurilor la utilizarea produsului.

Faza II, treapta A a analizei începe cu o evaluare mai detaliată a expunerii mediului la ingredientele active din produsul medicinal veterinar și prezintă datele despre evoluția și efectele acestora în mediu. Dacă riscul calculat este mai mare decât 1, conform indicațiilor din ghidul EMEA, analiza riscului de mediu continuă în treapta B. Pentru o analiză a impactului asupra mediului toate informațiile relevante pentru

evaluarea produsului medicinal veterinar vor fi incluse în evaluare, fie că sunt favorabile sau nefavorabile pentru produs (vezi Anexa I din Directiva 2001/82/EC, amendată). Datele relevante obținute din literatură trebuie incluse întotdeauna în documentație. Informațiile necesare pentru analizele Faza I și Faza II sunt discutate în capitolele evaluării. Toate informațiile sunt evaluate și rezumate pentru a determina astfel gradul de încredere și utilitatea lor.

Concentrația predictibilă a substanței active în sol, calculată inițial, mai mare de 0,1 mg/kg, determină trecerea evaluării în Faza II, Treapta A.

Excreția, metabolismul, degradarea în dejecții, căile de intrare a substanței active în mediu, și practicile agriculturii, influențează expunerea la mediu și valoarea riscului rafinat ($R_{raf} > 1$) determină posibilitatea trecerii la o evaluare de **Fază II, Treapta B**.

Pe parcursul distribuției, ingredientul activ poate fi încorporat în sol sau în materialul sedimentar ca reziduu latent sau transformat în metaboliți sau dioxid de carbon. Mineralizarea sau degradarea substanțelor active sunt considerate puncte de final ale studiilor de biodegradare. În unele cazuri, metaboliții componentilor organici sunt mai hidrofilii decât componentul de bază, deci există o mai mare posibilitate să se scurgă în apele subterane. Acest efect poate fi avut în vedere într-o abordare specială a rezidului total. Astfel, datele pentru metaboliți pot fi cerute dacă o asemenea cerere poate fi justificată științific.

Expunerea păsărilor și mamiferelor, prin aplicarea dejecțiilor cu reziduuri de substanțe active dintr-un produs veterinar pe terenuri agricole și pe fânețe, este posibilă, din cauza faptului că aceste specii non-țintă sunt expuse la produse prin intermediul hranei și apei.

Expunerea solului trebuie să ia în considerare împrăștierea tuturor excrementelor provenite de la fermă și apa reziduală. Expunerea directă a solului la animalele de pe pășune trebuie de asemenea luată în considerare.

Expunerea mediului acvatic trebuie să ia în considerare evacuarea și scurgerea ingredientului activ în apele de suprafață și apele subterane precum și orice alte căi de expunere a mediului acvatic. Pentru fermele piscicole va exista o expunere directă a mediului acvatic, dar poate exista și expunerea solului datorată împrăștierei reziduurilor lichide din bazine. Este necesară cunoașterea perioadei de înjumătățire a degradării ingredientelor active în compartimentele de interes ale mediului.

Pe parcursul acestei părți a evaluării, proprietățile fizico-chimice ale ingredientelor active, influența luminii, pH-ului, umidității, degradarea și alți factori trebuie luați în considerare. Cinetica eliminării ingredientului activ din compartimentele de interes ale mediului va furniza informații valoroase despre evoluția în mediu. Datele de toxicitate cronică sunt mai puțin disponibile decât datele acute și gama de proceduri standardizate de testare este mai mică.

Datele generate în conformitate cu Ghidul de testare 210 și 211 al Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică (OCDE) sunt acceptate.

Evaluarea expunerii, ținând cont de toate aspectele cu privire la utilizarea produsului medicinal veterinar și cu privire la emisia substanței active în mediu conduce la stabilirea valorii concentrației predictibile de mediu (PEC).

Evaluarea efectelor, ținând cont de toate datele de toxicitate și de factorul de evaluare (FA) corespunzător, conduce la stabilirea valorii concentrației predictibile fără efect (PNEC).

Riscul calculat raportând PEC la PNEC poate fi acceptabil (subunitar) și evaluarea încheiată.

Dacă $R \geq 1$, evaluarea din faza II treapta A continuă cu rafinarea concentrațiilor predictibile în sol, apă, sediment, luând în considerare producția de metabolism ai substanțelor active (fracția activă de metabolism Fa), degradarea în dejecții și degradarea în sol (atunci când dejecțiile sunt răspândite în mai mult de o etapă) a substanțelor active din produsul medicinal veterinar analizat (Figura 1.6).

Concentrațiile predictibile în mediu rafinate sunt comparate cu PNEC-urile calculate din datele de ecotoxicitate pentru fiecare specie tratată cu produsul medicinal veterinar, pentru toate compartimentele de mediu (sol, apă freatică, apă de suprafață, sediment), pentru determinarea riscului rafinat (R_{raf}).

Dacă $R_{raf} > 1$, se continuă evaluarea riscului în Faza II Treapta B și se iau în considerare testele de ecotoxicitate cronică, fiind necesară o rafinare a PNEC-urilor.

Dacă utilizarea produsului medicinal veterinar menține un risc pentru un compartiment de mediu, se prezintă studii de teren bazate pe scenarii mai realiste și se continuă evaluarea riscului în Faza II Treapta C. După efectuarea tuturor studiilor, în urma analizei riscuri - beneficii se ia o hotărâre cu privire la introducerea pe piață a medicamentului veterinar [20, 25-36].

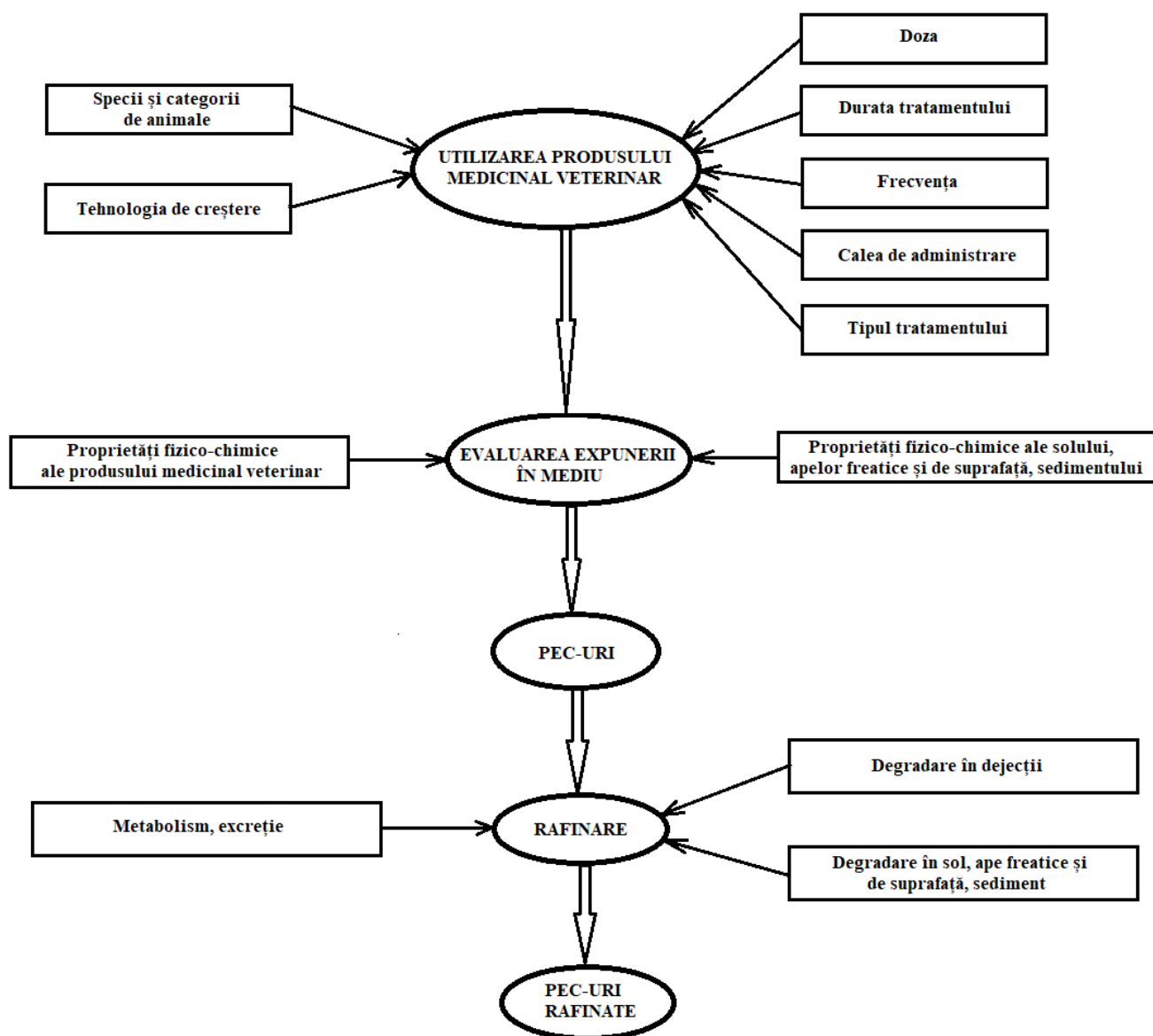


Figura 1.6. Rafinare PEC-uri

1.3. Stadiul actual al cercetării privind evaluarea impactului asupra mediului a medicamentelor veterinare

Abordarea strategică a Uniunii Europene privind impactul substanțelor farmaceutice asupra mediului (Bruxelles, septembrie 2020), consideră necesare măsuri eficace și cercetări suplimentare pentru reducerea impactului substanțelor farmaceutice asupra mediului și necesitatea reglementării nivelului reziduurilor farmaceutice în legislația din domeniul apei. Consiliul European a cerut Comisiei să evalueze și să definească măsurile legislative pentru combaterea dezvoltării rezistenței la antimicrobiene, să sprijine dezvoltarea de substanțe farmaceutice mai puțin nocive pentru mediu, să se asigure că solicitanții prezintă o evaluare completă a riscului pentru mediu în vederea obținerii autorizației de comercializare a produsului, astfel încât să poată fi stabilite și publicate măsurile de gestionare a riscurilor.

Deoarece monitorizarea substanțelor farmaceutice în mediu, inclusiv în sol, este încă foarte limitată se solicită consolidarea unor mecanisme de supraveghere, după introducerea pe piață, care să includă date referitoare la impactul produsului asupra mediului.

Autoritățile competente trebuie să creeze o bază de date centralizată și securizată, care să permită tuturor specialiștilor să aibă acces la rezultatele evaluărilor privind riscurile produselor farmaceutice pentru mediu și să consolideze planul european „O singură sănătate” (One Health) care are ca obiectiv

interconectarea dintre sănătatea umană și cea animală și cuprinde în prezent și evaluarea impactului asupra mediului a substanțelor farmaceutice din produsele veterinare.

Evaluarea riscurilor pentru mediu, obligatorie pentru obținerea autorizației de introducere pe piață pentru medicamentele de uz veterinar este principalul mijloc de asigurare a siguranței pentru mediu. Cu toate acestea, riscurile pentru mediu persistă. Mai multe state membre (Țările de Jos și Suedia), Parlamentul European, țări terțe (Elveția), organizații internaționale (Organizația Națiunilor Unite, HELCOM, Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică), asociații industriale și organizații neguvernamentale și-au exprimat îngrijorarea și au luat măsuri pentru reducerea substanțelor farmaceutice în mediu.

La nivel internațional, Agenda 2030 a Organizației Națiunilor Unite, în special obiectivul de dezvoltare durabilă nr. 6, și declarația ministerială din 2017 a Adunării Organizației Națiunilor Unite pentru Mediu reprezintă angajamente de acțiune pentru protecția mediului iar Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a convenit asupra unei acțiuni privind rezistența la antimicrobiene.

Ca urmare a contaminării solului și a apei cu reziduuri farmaceutice, Comisia Europeană a publicat o listă de acțiuni, în scopul reducerii reziduurilor de medicamente în mediu și care urmează să fie puse în aplicare pentru atingerea nivelurilor minime de poluare până în 2030, menținând în același timp disponibilitatea medicamentelor.

Good Manufacturing Practices (GMP) și Best Available Techniques (BAT) sunt instrumente importante pentru prevenirea și controlul emisiilor de poluanți în mediu care pot interveni în sprijinul protecției mediului.

Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică (OECD) a făcut o recomandare într-un raport recent privind reziduurile farmaceutice din apa de suprafață, concretizată într-o serie de măsuri pentru a limita eliberarea reziduurilor farmaceutice în mediu.

Suedia, stat membru al UE, a propus deja ca măsurile de prevenire a eliberării de ingrediente active din fabricile producătoare de medicamente să fie încorporate în reglementările privind medicamentele de uz veterinar [37, 38].

Expansiunea actuală a producției de acvacultură poate fi gestionabilă doar prin utilizarea produselor medicinale veterinare disponibile pentru utilizare în sistemele de acvacultură. Riscul de mediu care poate decurge din utilizarea acestor produse a câștigat o atenție sporită în ultimii ani. Deoarece acvacultura este practică în compartimente de mediu foarte diferite evaluarea de risc se face în funcție de mediul real (marin sau apă dulce), pe baza unor modele de expunere potrivite și ușor de aplicat, utilizate pentru rafinarea concentrațiilor predictibile de produs medicinal veterinar.

Orientările actuale VICH ar putea să nu fie suficiente de protectoare pentru a aborda unele efecte adverse asupra organismelor nețintă (de exemplu, dezvoltarea rezistenței antimicrobiene).

Analizele riscului de mediu efectuate în prezent au la bază cele mai potrivite studii pentru a evalua efectele ecotoxicologice asupra organismelor nețintă.

O schimbare a paradigmei evaluărilor actuale ale pericolelor și riscurilor de mediu, este recomandarea de a dezvolta evaluări active pe bază de substanțe, care să înlocuiască evaluările de risc efectuate pe produse [39, 40-43].

Conferința anuală privind dreptul european al mediului (2022) răspunde cerințelor specialiștilor în dreptul mediului pentru a fi la curent cu cele mai recente evoluții în materie de legislație, jurisprudență și bune practici în acest domeniu. Evenimentul va facilita schimbul de experiență între practicienii în drept, judecătoria și autoritățile de reglementare cu privire la provocările și oportunitățile actuale din legislația UE în domeniul mediului.

Antibioticele sunt folosite într-o gamă largă de medicamente de uz veterinar. Un procent de 20% din medicamentele veterinare (147 de tone de substanță activă pe an) vândute în Franța, sunt antibiotice (ANSES 2015). Majoritatea sunt rezistente la biodegradare după ingestie și pot fi persistente în mediu. Reziduurile de antibiotice au fost detectate ca poluanți în diverse compartimente de mediu și provoacă amenințări umane și de mediu, în special cu privire la potențiala apariție și proliferare a bacteriilor rezistente la antibiotice. În acest context, proiectul ANTIBIOTOX (studiul antibioticelor și a genelor de rezistență asociate în 210 agroecosisteme, riscul ecotoxicologic pentru mediu acvatic) este un proiect inovator finanțat de ANR franceză (Agence National de Recherche; contract nr. ANR-17-CE34-0003, 2018-2022) care urmărește dezvoltarea unei abordări complexe în domeniile chimiei, biochimiei, microbiologiei de mediu, geneticii, biologiei moleculare și ecotoxicologiei pentru a studia căile de biodegradare și estimarea

impactului ecotoxicologic în mediul acvatic și terestru al antibioticelor. În acest context, proiectul își propune să studieze soarta și impactul asupra mediului a două antibiotice din clasa sulfonamidelor, sulfametazina (SMZ) și sulfametoxazol (SMZ) utilizate în medicina veterinară și să ofere noi perspective asupra impactului ecotoxicologic al reziduurilor de antibiotice veterinare/umane.

Spania a fost aleasă ca exemplu, datorită importanței care o acordă pentru biodiversitate, și pentru utilizarea medicamentelor veterinare (European Union's Horizon 2020 Research and Innovation programme, Grant/Award Number: 773830). S-au construit hărți de vulnerabilitate a solului, s-au adus informații despre utilizarea antibioticelor, recensământul animalelor și despre tipul de creștere (animale crescute intensiv sau pe pășune). Ca antibiotice majore, tetraciclinele și beta-lactamele au contribuit mai mult la vulnerabilitatea solului decât antibioticele mai puțin utilizate. Porcii crescuți intensiv au dus la o vulnerabilitate mai mare decât celelalte tipuri de animale. A fost dezvoltat un tablou de bord Shiny pentru a vizualiza rezultatele riscurilor de mediu în detaliu și pentru a realiza o bază solidă de date despre utilizarea medicamentelor veterinare, despre recensământul animalelor și tipul de creștere.

În Uniunea Europeană medicamentele de uz veterinar sunt autorizate pe baza unei proceduri de evaluare a riscurilor de mediu, procedură aplicată centralizată (la nivel global) sau printr-o procedură descentralizată și de recunoaștere reciprocă (la nivel de stat membru). Indiferent de nivel, cadrul de evaluare a riscurilor este același pentru orice procedură urmată. În urma unei analize a datelor, numai de la produsele autorizate la nivel central, deoarece nu a fost posibilă accesarea datelor de la produse autorizate la nivel national, în statele membre individuale, a rezultat că, în general, majoritatea produselor farmaceutice de uz veterinar (> 95%) sunt considerate a avea o eliberare limitată în mediu, iar evaluarea riscului lor se încheie după o evaluare de cel mai scăzut nivel (faza I, așa cum este prezentată în VICH GL6). În ciuda presupunerii că, în cele mai multe cazuri, contaminarea cu reziduuri veterinare este scăzută și, prin urmare, produsele sunt scutite de evaluările de risc de mediu de nivel superior, care necesită date specifice pentru profilul de siguranță al substanțelor, poluarea mediului cauzată de substanțele farmaceutice este o problemă emergentă. În urma intrării în vigoare a Directivei-cadru revizuite privind apa (2008/105/CE) în 2013, și de la obligația legislativă care rezultă pentru Comisia Europeană de a dezvolta o abordare strategică pentru reducerea poluării apei din substanțe farmaceutice, au fost demarate acțiuni care vizează reducerea emisiilor totale de la produsele medicamentoase de uz veterinar și limitarea utilizării de substanțe foarte periculoase în compoziția acestora (de exemplu, substanțe PBT/vPvB).

Se solicită, de asemenea, o revizuire a caracterului evaluărilor actuale ale pericolelor și riscurilor pentru mediu, prin recomandarea de a se dezvolta evaluări bazate pe substanțe active, îndepărtându-se de evaluările bazate pe produse. Impactul potențial al reziduurilor farmaceutice asupra oamenilor și faunei sălbatice este o problemă de îngrijorare din ce în ce mai mare, deoarece studiile privind concentrațiile de produse farmaceutice în apele de suprafață, precum și efectele acestora asupra populațiilor de animale sălbatice sunt raportate din ce în ce mai frecvent în publicațiile științifice. În concluzie, strategia CE și noua reglementare veterinară indică faptul că există un climat favorabil pentru revizuirea abordării actuale a evaluării riscurilor de mediu ale medicamentelor de uz veterinar (de exemplu, explorarea unei evaluări bazate pe substanțe). și, de asemenea, pentru investigarea extinderii domeniului de aplicare a acestuia (de exemplu, evaluarea impactului emisiilor de la locurile de producție) [44].

Deoarece în prezent o parte din sistemele de creștere a animalelor se îndreaptă către creșterea ecologică și creșterea în aer liber, se prefigurează un risc mai redus de consum de produse medicamentoase veterinare în general, însă excrețiile de animale care eventual conțin substanțe active din aceste produse ar putea fi eliberate direct în mediu în loc să fie depozitate și aplicate. ca gunoi de grajd. Prima fază a procedurii actuale de evaluare a riscurilor de mediu pentru produsele medicamentoase veterinare din UE a fost analizată critic din punct de vedere al schimbărilor în creșterea animalelor. În acest sens un număr mare de valori implicite utilizate în procedura actuală de evaluare a riscurilor de mediu pentru produsele medicamentoase veterinare a fost verificat pentru actualizare. Într-o abordare în trei etape, mai întâi au fost colectate tendințele și schimbările actuale relevante de creșterea animalelor în Europa, apoi au fost evaluate interacțiunile dintre faza I a procedurii de evaluare a riscurilor de mediu pentru produsele medicamentoase veterinare și sistemele actuale de creștere a animalelor și, în cele din urmă, au fost verificate valorile implicite utilizate în faza I a procedurii de evaluare a riscurilor de mediu pentru produsele medicamentoase veterinare, pentru a identifica lacunele de cercetare. Din analiză a rezultat că mai multe valori implicite utilizate în ERA actuală au fost identificate ca fiind învechite. În concluzie rezultatele prezentului studiu

indică faptul că este necesară o actualizare procedurii de evaluare a riscurilor de mediu pentru produsele medicamentoase veterinare în UE pentru a lua în considerare schimbările în creșterea animalelor [45].

Regulamentul (UE) 2019/6 (denumit „noul regulament veterinar NVR”), aplicabil din 2022, ia în considerare interesul sporit pentru protecția mediului și adoptă anumite măsuri în consecință. De exemplu, printre măsurile implementate, NVR solicită CE să investigheze fezabilitatea unui sistem de revizuire bazat pe substanțe active (așa-numitul „sistem de monografie”) și alte alternative potențiale adecvate pentru evaluarea impactului supra mediului a tuturor produsele medicamentoase veterinare în UE. O analiza a eficacității legislației actuale și viitoare pentru a proteja mediul și a reduce sarcina de reglementare este foarte utilă pentru a identifica punctele slabe și punctele forte ale ambelor [46].

Ivermectina (IVM) este un produs farmaceutic antiparazitar utilizat în întreaga lume pentru proprietățile sale în tratamentul mai multor boli la oameni și animale (un studiul recent menționează o posibilă utilizare împotriva COVID-19). Utilizarea veterinară a IVM poate duce la un risc inacceptabil și nesustenabil atât pentru ecosistemele acvatice, cât și pentru cele terestre. IVM prezintă o acută foarte mare și toxicitate cronică pentru crustacee. La pești, IVM poate provoca letargie, piele întunecată și comportament redus de hrănire. Mai mult, inhibarea creșterii pentru alge și toxicitate ridicată pentru au fost subliniate organisme terestre și insecte de bălegar. Pe baza acestor constatări, se sugerează o reducere (sau eliminare) a utilizării acestei substanțe ca medicament veterinar având în vedere riscul de mediu ridicat, în special pentru ecosistemele acvatice. Dacă utilizarea IVM va fi autorizată ar trebui să fie aplicate măsuri mai stricte în scopul reducerii și/sau atenuării impactului a IVM asupra mediului și organismelor acestuia [47].

Biosorbția s-a dovedit a fi un mecanism important în îndepărtarea produselor medicinale veterinare din clasa antibioticelor prin procesele de tratare a apei pe bază de microalge. Adsorbția produselor medicinale veterinare: tetraciclină (TET), ciprofloxacina (CIP), sulfadiazină (SDZ) și sulfametoxazol (SMX) pe un consorțiu uscat de microalge-bacterii *Scenedesmus almeriensis* a fost studiată la mai multe concentrații de echilibru (20 până la 1000 μg/000). L). Acest studiu a relevat faptul că consorțiul *S. almeriensis*-bacterii are o putere mare de biosorbție și a demonstrat că biosorbția este un mecanism important în eliminarea ciprofloxacinei și tetraciclinei folosind un proces de tratare a apei pe bază de microalge. Cu toate acestea, eliminările de sulfadiazină și sulfametoxazol nu au depășit 32% [48].

Se menționează că atunci când un produs este luat în considerare pentru autorizarea pe piață, riscurile de mediu ar trebui să fie luate în considerare în analiza riscuri-beneficii. Cu toate acestea au fost publicate mai multe studii care dezvăluie niveluri considerabile de reziduuri în apele de suprafață, în râuri și lacuri din întreaga Europă, ceea ce ridică întrebarea dacă legislația actuală și sistemul de evaluare a riscurilor de mediu ale medicamentelor de uz uman și veterinar sunt suficient de protectoare [49].

Riscurile de mediu nu sunt direct comparabile cu beneficiile terapeutice și de aceea nu există o abordare standardizată pentru a compara atât riscurile de mediu, cât și beneficiile terapeutice. În acest sens au fost dezvoltate trei metode de comunicare și comparare a beneficiilor terapeutice și a riscurilor de mediu pentru evaluarea beneficiu-risc care sprijină procesul de autorizare UE. Două dintre aceste metode sprijină evaluarea independentă a produsului (adică, o clasificare sumativă și o clasificare vizuală cu matrice de scor); celălalt sprijină o evaluare comparativă între produse alternative, adică, o clasificare comparativă [50].

Orientările actuale ale UE pentru evaluarea riscurilor de mediu ale produselor medicamentoase veterinare în apele subterane sugerează o abordare bazată pe comparația dintre concentrația calculată în apele freactice (PECapă freatică) și o concentrație de prag, stabilită arbitrar, de 0,1 μg/l care reprezintă limita superioară a concentrației de pesticide din apele subterane în UE. Dacă PECapă freatică calculat nu depășește pragul, atunci riscul este considerat acceptabil. Se presupune că concentrația de 0,1 μg/l este în mod implicit sigură atât pentru oameni, cât și pentru organismele expuse din apele freactice [51].

Reziduurile de produse medicinale veterinare intră în mediu prin aplicarea dejecțiilor pe zonele agricole unde, în special, antibioticele pot provoca fitotoxicitate. Testele pe plante terestre conform ghidului OCDE 208 fac parte din evaluarea riscurilor de mediu ale produselor medicamentoase veterinare [52].

Conform datelor provenite din sistemul olandez RICA și colectate de Wageningen Economic Research, pentru 17 produse medicinale cu potențial îngrijorător, în Țările de Jos, s-au evaluat sursele și emisiile datorate aplicărilor dejecțiilor în sol. Prin urmare, s-a examinat utilizarea produselor medicinale veterinare în patru sectoare zootehnice din Țările de Jos în perioada 2015-2018 și s-au cuantificat ratele de excreție a animalelor și disiparea în timpul depozitării dejecțiilor. Pentru aproape toate medicamentele

veterinare, cantitățile administrate animalelor în perioada 2015–2018 au scăzut. Concentrațiile substanțelor active din medicamentele veterinare supuse studiului, pe o perioadă de depozitare de șase luni a scăzut între 10 și 98% în funcție de compus. Concentrațiile măsurate în suspensii după depozitare sunt în concordanță cu concentrațiile predictibile calculate conform ghidului EMEA [53].

Riscul ecotoxicologic al amestecurilor farmaceutice depășește de obicei riscul fiecărui compus individual, ceea ce atrage o atenție specială asupra faptului că sondajele de monitorizare găsesc în mod obișnuit amestecuri farmaceutice complexe în diferite compartimente de mediu. Cu toate acestea, deși volumul de date privind ecotoxicologia amestecurilor farmaceutice este destul de consistent, liniile directoare actuale pentru evaluarea riscurilor de mediu ale produselor farmaceutice adesea nu abordează în mod explicit efectele amestecurilor. Se acordă o atenție specială la renunțarea la evaluările riscurilor de mediu la care pe baza expunerii componentele unui amestec prezintă concentrații scăzute, individual netoxice, dar care în amestec s-ar putea combina pentru a produce efecte substanțiale de amestec [54].

Pe baza conceptului One Health care consideră că sănătatea umană este strâns legată de sănătatea animală și a mediului, se prezintă utilizarea unor animale precum albinele și alți polenizatori ca sentințele pentru contaminarea mediului sau indicatori biologici [55].

Cele mai recente date raportate de Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară (EFSA) arată că reziduurile de medicamente veterinare și alte substanțe găsite în animale și alimente de origine animală continuă să scadă în Uniunea Europeană, iar nivelurile de conformitate sunt în creștere. În 2021, procentul probelor neconforme a fost de 0,17%, cea mai mică cifră înregistrată în ultimii 12 ani când neconformitatea a variat între 0,19% și 0,37%. Cifra pentru 2020 a fost de 0,19%. Nivelul general de neconformitate în probele vizate (adică cele prelevate pentru a detecta utilizări ilegale sau a verifica nerespectarea nivelurilor maxime permise) a scăzut, de asemenea, la 0,24%, comparativ cu 0,27%-0,35% în ultimii patru ani. Raportul (EFSA) include hormoni, antibacterieni, contaminanți de mediu, substanțe interzise și alte medicamente de uz veterinar [176].

CAPITOLUL 2

CERCETĂRI PROPRII DE EVALUARE A RISCULUI DE MEDIU PENTRU MEDICAMENTE VETERINARE

2.1. Medicamente veterinare analizate

Medicamentele veterinare sunt utilizate pe scară largă pentru a trata bolile și pentru a proteja sănătatea animalelor și au potențialul de a fi eliberate în mediu. Comportamentul medicamentelor veterinare este investigat mai amănunțit pentru a obține informații complexe cu privire la impactul lor asupra mediului. În consecință, deținătorul autorizației de introducere pe piață a produsului veterinar oferă o evaluare către autorități, ca parte a procesului de autorizare. Produsul este autorizat pentru vânzare numai în cazul în care autoritatea sanitară veterinară este convinsă că riscul de mediu este suficient de scăzut. Acest studiu este efectuat pentru a obține o mai mare înțelegere a riscului de mediu, pentru a avea informații cu privire la concentrațiile reale ale medicamentelor veterinare aprobate pentru a fi comercializate.

În vederea obținerii autorizației de comercializare, am efectuat evaluări de impact asupra mediului, conform prevederilor legislației europene pentru medicamente veterinare, validate de Institutul de control al produselor biologice și medicamentoase veterinare (ICBMV).

Metoda analitică conform ghidului EMEA este o metodă complexă care presupune multe calcule. Pentru o evaluare rapidă și eficientă a impactului asupra mediului al produselor medicinale veterinare, am creat o metodă software care parcurge explicitat toate etapele ghidului și vine în sprijinul specialiștilor ERA.

Am efectuat în această teză evaluări de impact asupra mediului prin metoda analitică pentru următoarele medicamente veterinare: **LIN – SPE – MIX 880** - pulbere hidrosolubilă pentru suine și găini, **Levasol 10%** - soluție orală pentru bovine, ovine, caprine, suine și păsări, **Florfenicol FP 10%** - soluție orală pentru găini, broileri, și suine, **Tiasol 10%** - soluție orală, indicată la suine, iepuri și păsări (găini, broileri, curcani).

Am efectuat în această teză evaluări de impact asupra mediului prin cele două metode, analitică și software pentru următoarele medicamente veterinare: **Amprolium FP 25%** - premix pentru găini, broileri, curcani și **Benzilpenicilina potasica 25%** - pulbere orală pentru porci, broileri și curcani.

Am selectat să prezint în această teză *aspecte* din evaluarea unor medicamente de uz veterinar ale căror substanțe active au un potențial ridicat de a pătrunde în mediu dar care în urma analizei au dovedit un risc acceptabil pentru mediu : amprolium, florfenicol, penicilina G, levamisol, tiamulin, lincomicină, spectinomycină.

2.2. Evaluarea analitică a riscului de mediu pentru levamisol

Produsul LEVASOL 10% - soluție orală pentru bovine, ovine, caprine, suine și păsări, are ca substanța activă levamisolul hidroclorid, un antihelmintic din clasa imidazotiazolilor. Produsul conține 100 mg/ml levamisol clorhidrat.

Metabolismul levamisolului este foarte intens, astfel încât substanțele reziduale în țesuturi, urină și excremente constau în principal din metaboliți ai acestuia. Eliminarea este foarte rapidă, principalele căi fiind prin urină și prin bilă.

Se administrează 10 mg substanță activă/kg greutate corporală la bovine, ovine, suine și 20 - 30 mg substanța activă / kg greutate corporală la păsări, o singură zi. Cea mai importantă cale de expunere a mediului este excreția substanței active ca atare și a metaboliților săi. Excretele care rezultă sunt depozitate și aplicate pe sol într-o etapă ulterioară.

Concentrațiile rezultate în aceste compartimente de mediu, vor fi determinate de proprietățile fizico-chimice ale substanței active, de partitionarea sa în sol și sedimente, de degradarea abiotică și biotică de degradarea substanței active în dejectiile lichide și solide și de caracteristicile de mediu (inclusiv tipul de sol, condițiile climatice).

Se calculează PECsol initial (conform ghidului EMEA) pentru fiecare specie țintă și categorie tehnologică. (Tabel 2.1).

Tabel 2.1. PECsol, apă freatică, apă de suprafață și sediment inițial levamisol

Parametru Specia și categoria	PEC _{sol} [mg/kg]	PEC _{apăfreatică} [mg/l]	PEC _{apăsuprafață} [mg/l]	PEC _{sediment} [mg/kg]
suine intensiv	0,086	0,0004	0,0004	0,082
curcani	0,132	0,0007	0,0006	0,126
broileri intensiv	0,266	0,001	0,0004	0,082
rațe	0,185	0,001	0,0009	0,176
bovine intensiv	0,058	0,0003	0,0004	0,082
bovine pășune	0,020	0,0001	0,0001	0,019
ovine pășune	0,016	0,00008	0,00008	0,015

Va fi utilizata cea mai nefavorabila valoare a PEC_{sol}. Întrucât valoarea PEC_{sol} inițial pentru specia țintă broileri este mai mare de 0,1 mg/kg, evaluarea riscului pentru mediu trebuie să continue în Faza II, treapta A.

Formula moleculară a levamisolului clorhidrat este C₁₁H₁₃ClN₂S iar formula structurală, (S)-6-Phenyl-2,3,5,6-tetrahydroimidazo [2,1b] [1,3] thiazole hydrochloride, este prezentată în Figura 2.1.

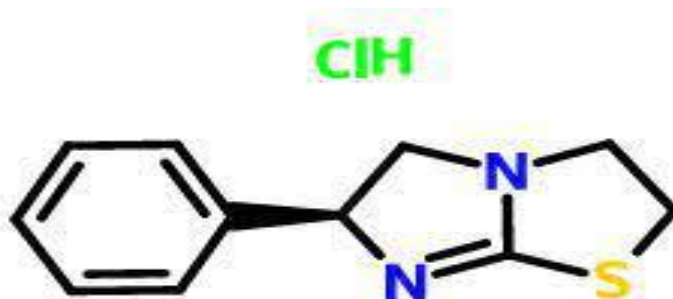


Figura 2.1. Structura levamisol clorhidrat [177]

În Faza II treapta A. se evaluează potențialul produsului LEVASOL 10%, de a afecta organismele din mediu (acvatic, terestru).

Levamisolul este distribuit uniform în tot organismul animalului tratat și este metabolizat aproape în totalitate, cu excepția unui procent de 6%, care este excretat nemodificat prin urină.

Levamisolului hidroclorid este fotodegradabil (Sweetman). Valoarea 15,02 mg/l pentru EC50 (Basnyat, 2010), testat pe bacteriile din nămolul activ indică toxicitatea levamisolului pentru bacteriile din nămol. Datele disponibile despre levamisol folosite în evaluarea de risc de mediu sunt prezentate în Tabelul 2.2.

Tabel 2.2. Parametrii de evaluare risc de mediu levamisol

Proprietate	Parametru	Valoare parametru
Fizico-chimice	Solubilitate în apă	210000 mg/l (25 °C)
	Punct de topire	227-229°C
	Presiune de vapori	0,0148 Pa
Mobilitate în sol	Koc	3764 l/kg
Persistența în sol	DT 50 (zile)	sol, 20 °C = 720 ore
		apa, 20 °C = 360 ore
		aer, 20 °C = 7,72 ore
Bioacumulare	Log Kow	1,84
Degradare în dejecții	Fracțiunea de substanță activă încă prezentă în dejecții după 24 de zile (%)	-

National Library of Medicine PubChem

Valorile de toxicitate experimentală disponibile și predictibile au indicat faptul că toxicitatea levamisolului la organismele acvatice și terestre este scăzută. PNEC apă determinat este prezentat în Tabelul 2.3.

Tabel 2.3. PNEC apă levamisol

Specie	Parametru / valoare mg/L	FA VICH	PNEC (mg/l)
Pesti 96 ore	LC ₅₀ = 8,038	100	0,080
Alge sau alte plante acvatice 96 ore	EC ₅₀ = 17,231	100	0,172
Nevertebrate acvatice	EC ₅₀ =300	100	3
Crustacea (Daphnia magna) 384 ore	EC ₅₀ = 1,967	100	0,019
Zebra fish	LC ₅₀ = 32	100	0,32

(OECD 201, OECD 202, OECD 203, OECD 220/222)

S-a luat în considerare în calculele următoare cea mai sensibilă valoare de toxicitate:

Crustacea 384 ore, EC₅₀ = 1,96, mg/l, FA =100, **PNEC_{apa} = 0,019mg/L**

Calculul PNEC sol și PNEC sediment luând în considerare PNEC apă (determinat din rezultatul efectelor determinate experimental), se efectuează utilizând EPM (metoda de partitionare echilibrată), conform relațiilor 1.1 și 1.2. Au rezultat **PNEC_{sol} = 1,26 mg/kg** și **PNEC_{sed} = 1,56 mg/kg**.

Pentru a putea estima efectele adverse asupra ecosistemelor solului, a fost realizată o analiza de risc. Pentru a determina riscul (R), PEC-urile inițial calculate sunt comparate cu PNEC-ul calculat din datele de ecotoxicitate disponibile ($R = PEC / PNEC$) (Tabel 2.4).

Tabel 2.4 Riscul levamisolului, R

Parametru Specia și categoria	R _{inisol}	R _{iniapăfreatică}	R _{iniapăsupraf}	R _{inisediment}
broileri	0,21	0,05	0,02	0,05
curcani	0,10	0,03	0,03	0,08
rațe	0,14	0,05	0,04	0,11
bovine intensiv	0,04	0,01	0,02	0,05
bovine pășune	0,01	0,005	0,005	0,012
ovine pășune	0,01	0,004	0,004	0,009
suine	0,06	0,02	0,02	0,05

Valorile riscului pentru mediu foarte mici ($R < 1$), pentru toate speciile fac ca evaluarea să se oprească aici și rezultă că produsul medicinal veterinar nu ar prezenta nici un risc asupra ecosistemului.

Compararea dozelor zilnice reale calculate pentru levamisol, cu doză zilnică acceptabilă (DZA) sugerează că pentru compusul studiat expunerea consumatorilor la produsele medicamentoase de uz veterinar din sol prin intermediul plantelor, este considerată sub DZA și că riscul direct pentru sănătatea umană este, prin urmare, scăzut.

Rezultatele studiilor indică faptul că nu există posibilitatea de contaminare cu levamisol a apei freatică. Cu toate acestea, există un risc de contaminare în cazul unor scurgeri accidentale sau a unor practici foarte precare de management al fermei.

Degradarea levamisolului în dejecții pe parcursul depozitării (DT₅₀ = 5 -75 zile la 25°C), conduce la o valoare pentru PEC_{sol} rafinat pe baza degradării în dejecții foarte mică pentru toate speciile tratate [56 -70].

2.3. Evaluarea analitică a riscului de mediu pentru tiamulin

Produsul TIASOL 10% - soluție orală pentru suine, iepuri și păsări (găini, broileri, curcani) are ca substanța activă tiamulin hidrogen fumarat, un antibiotic bacteriostatic, derivat semisintetic (carboxipenicilin) care aparține grupei pleuromutilinelor. Produsul conține 100 mg/ml tiamulin hidrogen fumarate.

Soluția de Tiasol se metabolizează aproape în întregime și se elimină prin bilă și fecale. În total, 11 metaboliți au fost identificați și cuantificați în bilă. Acești metaboliți identificați și compusul părinte rămas cuprind 60% din totalul excretat, restul de 40% cuprinzând metaboliți prezenți la concentrații prea scăzute pentru a permite izolarea și identificarea. Concentrațiile individuale ale metaboliților excretați au fost sub 20% din cantitatea aplicată de tiamulin și, prin urmare, nu a trebuit să fie incluși în evaluarea riscurilor.

Se administrează 12 mg tiamulin/kg greutate corporală la suine, iepuri timp de 7 zile și 20 mg tiamulin/kg greutate corporală la păsări (găini, broileri, curcani).

Cea mai importantă cale de pătrundere în mediu rezultă din excreția substanței active ca atare și a metaboliților săi. Excretele care rezultă sunt depozitate și aplicate pe sol într-o etapă ulterioară. Concentrațiile rezultate în aceste compartimente de mediu, vor fi determinate de proprietățile fizico-chimice ale substanței active, de partitionarea sa în sol și sedimente, de degradarea abiotică și biotică de degradarea substanței active în dejectiile lichide și solide și de caracteristicile de mediu (inclusiv tipul de sol, condițiile climatice).

Se calculează PECsol initial (conform ghidului EMEA) pentru fiecare specie țintă și categorie tehnologică. (Tabel 2.5).

Tabel 2.5. PECsol, apă freatică, apă de suprafață și sediment inițial tiamulin

Parametru Specia și categoria	PEC _{sol} [mg/kg]	PEC _{apăfreatică} [mg/l]	PEC _{apăsuprafață} [mg/l]	PEC _{sediment} [mg/kg]
suine intensiv	0,729	0,028	0,025	0,721
curcani intensiv	0,618	0,023	0,021	0,598
broileri intensiv	0,866	0,033	0,030	0,856
ieपुरi intensiv	0,605	0,023	0,021	0,598

Va fi utilizată cea mai nefavorabilă valoare a PECsol. Întrucât valoarea PECsol initial pentru specia țintă broileri este mai mare de 0,1 mg/kg, evaluarea riscului pentru mediu trebuie să continue în Faza II, treapta A.

Formula moleculară a tiamulinului hidrogen fumarat este C₃₂H₅₁NO₈S iar formula structurală (3aS,4R,5S,6S,8R,9R,9aR,10R)-6-Ethenyl-5-hydroxy-4,6,9,10-tetramethyl-1-oxodecahydro-3a,9-propano-3acyclopentacycloocten-8-yl[[2(diethylamino)ethyl]sulfanyl]acetate monofumarate, este prezentată în Figura 2.2.

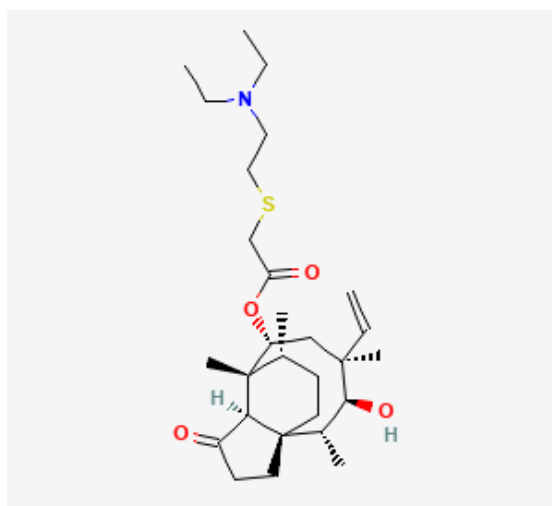


Figura 2.2. Structura Tiamulin hidrogen fumarat [178]

În Faza II treapta A. se evalueaza potentialul produsului TIASOL 10%, de a afecta organismele din mediu acvatic și terestru.

Spectrul de absorbție al tiamulinului poate fi utilizat pentru a prezice potențialul sau de a se fotodegrada. Datele arată că tiamulinul absoarbe lumina în domeniu spectral între 200 nm și 280 nm și nu absoarbe nici o lumină la o lungime de undă mai mare de 280 nm. Lumina naturală a soarelui are foarte puțină energie în domeniu de lungime de undă mai mare de 280 nm. Astfel, se prevede că, în condiții de lumină naturală, tiamulinul nu va fi fotodegradabil.

Datele disponibile despre Tiamulin hydrogen fumarat folosite în evaluarea de risc de mediu sunt prezentate în Tabelul 2.6.

Tabel 2.6. Parametrii de evaluare risc de mediu Tiamulin hydrogen fumarat

Proprietate	Parametru	Valoare parametru
Fizico-chimice	Solubilitate în apa	7580mg/l
	Constanta de disociere în apa, pKa	7,44
	Presiune de vapori	0,06 Pa
Mobilitate în sol	Koc	536 l/kg
Persistența în sol	DT 50 (zile)	10,2 (sol, 20 °C)
Persistența în dejecții	DT 50(zile)	49 zile (la 25 °C) 590 de zile (la 10 °C)
Bioacumulare	Log Kow	1,2 (pH 5,5)
		3,4 (pH 7)
		4,4 (pH 8,5)

(OECD 307, OECD 106, OECD 112, OECD 117, OECD 201, OECD 105)

PNEC apă determinat este prezentat în Tabelul 2.7.

Tabel 2.7. PNEC apă Tiamulin hydrogen fumarat

Specie	Parametru / valoare (mg/l / mg/kg)	FA VICH	PNEC (mg/l / mg/kg)
Pesti 96 ore	LC ₅₀ = 15,1	1000	0,015
Alge sau alte plante acvatice 96 ore	EC ₅₀ = 11,7	100	0,117
Crustacea (Daphnia magna) 384 ore	EC ₅₀ = 17,3	100	0,017
Earthworms și enchytraeids	NOEC = 1000	10	100

(OECD 201, OECD 202, OECD 203, OECD 220/222)

S-a luat în considerare în calculele următoare cea mai sensibilă valoare de toxicitate:

Alge 96 h, EC₅₀ = 11,7, mg/l, FA = 100, **PNEC_{apa} = 0,117mg/l**

Calculul PNEC sol și PNEC sediment luând în considerare PNEC_{apă} (determinat din rezultatul efectelor determinate experimental), se efectuează utilizând EPM (metoda de partitionare echilibrată), conform relațiilor 1.1 și 1.2. Au rezultat **PNEC_{sol} = 1,119 mg/kg** și **PNEC_{sed} = 1,452 mg/kg**.

Pentru a putea estima efectele adverse asupra ecosistemelor solului, a fost realizată o analiză de risc. Pentru a determina riscul (R), PEC-urile inițial calculate sunt comparate cu PNEC-urile determinate din datele de ecotoxicitate disponibile ($R = PEC / PNEC$) (Tabel 2.8).

Tabel 2.8. Riscul, R Tiamulin hydrogen fumarat

Parametru Specia și categoria	R_{inisol}	R_{inipăfreatică}	R_{inipăsupraf}	R_{inisediment}
broileri	0,77	0,28	0,25	0,58
curcani	0,55	0,19	0,17	0,41
iepuri	0,54	0,19	0,17	0,41
suine	0,65	0,23	0,21	0,49

Valorile riscului pentru mediu foarte mici ($R < 1$), pentru toate speciile fac ca evaluarea să se oprească aici și rezultă că produsul medicinal veterinar nu ar prezenta nici un risc asupra ecosistemului.

Valorile mici ale toxicității indică faptul că impactul tiamulinului asupra mediului este acceptabil. Degradarea rapidă a tiamulinului pe parcursul depozitarii dejectiilor ($DT_{50} < 13$ zile) faptul că nu persistă în sol, nu există posibilitatea acumulării în mediu, indica faptul că nu există un risc al tiamulinului asupra mediului [71- 90].

2.4. Evaluarea analitică a riscului de mediu pentru florfenicol

Produsul FLORFENICOL FP 10% - soluție orală pentru gaini (broileri, tineret înlocuire) și suine, are ca substanța activă antibioticul florfenicol, un derivat de tiamfenicol. Produsul conține 100 mg/ml florfenicol.

Florfenicolul este absorbit rapid în organismele animalelor tratate și jumătate din doza de florfenicol administrată se elimină din organism în forma inițială. Amina, acidul oxamic și alcoolul, metaboliții principali ai florfenicolului au o activitate antimicrobiană foarte redusă. Florfenicolul nu este volatil, prezintă absorbție în ultraviolet (UV) (maxim de absorbție 224 nanometri) și punctul său de topire este la 154 °C. Comparativ cu florfenicolul, produșii de metabolism sunt mult mai solubili (solubilitate > 500 g / l) și mult mai puțin lipofili.

Florfenicolul din medicamentul considerat este excretat în urină (97%), și în materiile fecale (3%).

Se administrează 2 mg florfenicol/kg greutate corporală la suine, 7 zile și 20 mg florfenicol/ kg greutate corporală la păsari (gaini, broileri), 5 zile. Excretele care rezultă sunt depozitate și aplicate pe sol într-o etapă ulterioară. Concentrațiile rezultate în aceste compartimente de mediu, vor fi determinate de proprietățile fizico-chimice ale substanței active, de partitionarea sa în sol și sedimente, de degradarea abiotică și biotică de degradarea substanței active în dejectiile lichide și solide și de caracteristicile de mediu (inclusiv tipul de sol, condițiile climatice).

Se calculează PEC_{sol} inițial (conform ghidului EMEA) pentru fiecare specie țintă și categorie tehnologică. (Tabel 2.9).

Tabel 2.9. PEC_{sol}, apă freatică, apă de suprafață și sediment inițial florfenicol

Parametru Specia și categoria	PEC_{sol} [mg/kg]	PEC_{apăfreatică} [mg/l]	PEC_{apăsuprafață} [mg/l]	PEC_{sediment} [mg/kg]
suine intensiv	0,082	0,068	0,062	0,156
broileri intensiv	0,886	0,736	0,667	1,681
găini intensiv	0,196	0,163	0,147	0,372

Va fi utilizată cea mai nefavorabilă valoare a PEC_{sol}. Întrucât valoarea PEC_{sol} inițial pentru specia țintă broileri este mai mare de 0,1 mg/kg, evaluarea riscului pentru mediu trebuie să continue în Faza II, treapta A.

Formula moleculară a florfenicolului este C₁₂H₁₄Cl₂FNO₄S iar formula structurală 2,2-dichloro-N-[(1R,2S)-3-fluoro-1-hydroxy-1-(4-methylsulfonylphenyl)propan-2-yl]acetamide este prezentată în Figura 2.2.

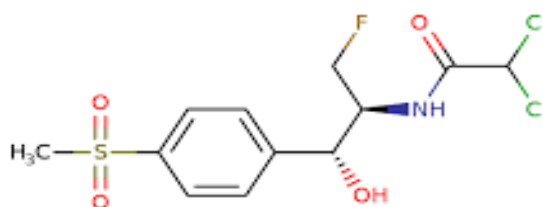


Figura 2.3. Structura Florfenicolului [179]

În Faza II treapta A. se evaluează potențialul produsului considerat, de a afecta organismele din mediu acvatic și terestru.

Din studiile disponibile privind fotoliza și hidroliza florfenicolului și a metabolitilor săi reiese că aceste procese nu influențează semnificativ degradarea lor în mediu (Connor, 1995; Fackler, 1991a-d).

Florfenicolul, cu o solubilitate în apă substanțială și cu un coeficient de partiție, log Kow extrem de scăzut, tinde să rămână în apă.

Degradarea florfenicolului (DT₅₀, DT₉₀) în trei sisteme diferite de sediment-apă, coeficientul de distribuție solid-apă (Kd) și coeficientul de sorbție pe carbon organic (Koc), sunt prezentate în Tabelul 2.10.

Tabel 2.10 Degradarea florfenicolului în sediment-apă

Sursa	Tip sediment	Carbon organic %	Degradarea sediment/ apă (zile)		Kd (l/kg)	Koc (l/kg)
			DT ₅₀	DT ₉₀		
apa salină	pământ fertil	3.2	13.0	43.1	0.293	9.1
apa	pământ fertil	2.4	8.4	27.8	0.434	18.1
apa	pământ nefertil	0.76	19.4	64.5	0.250	32.9

Valorile caracteristicilor de sorbție Kd și Koc pentru florfenicol sunt mici (Kd au fost determinate în intervalul 0.07-0.59 și Koc, 10-27, în intervalul 10-27) (Tabel 2.11).

Tabel 2.11 Adsorbția florfenicolului în sol

Adsorbția solului	Florfenicol	Metabolitii florfenicolului		
		Amina	Alcoolul	Acidul oxamic
sorbție (%)	2-10	23.9-39.9	1.3-8.2	7.5-43
Kd (l/kg)	0.07-0.59	1.56-3.35	0.07-0.45	0.41-3.78
Koc (l/kg)	10-27	162-241	7-76.5	36.4-642
Mobilitate	Foarte mobil spre mobile	Moderat	Foarte mobil spre moderat mobil	Mobil spre puțin mobil
Referinta	Fackler (1990)	Fackler (1991a)	Fackler (1991b)	Fackler (1991c)

Datele disponibile despre Florfenicol, folosite în evaluarea de risc de mediu sunt prezentate în Tabelul 2.12.

Tabel 2.12. Parametrii de evaluare risc de mediu Florfenicol

Proprietate	Parametru	Valoare parametru
Fizico-chimice	Solubilitate in apa	1,32mg/l
	Constanta de disociere in apa, pKa	7,5 l/kg Amine metabolit 1,99 l/kg Acid oxamic metabolit
	Presiune de vapori	0,06 Pa
Mobilitate în sol	Koc	18,38 l/kg
Persistența în sol	DT 50 (zile)	13 (sol, 20 °C)
Persistența în dejecții	DT 50(zile)	3,6
Bioacumulare	Log Kow	0,37 (pH 7)

(OECD 307, OECD 106, OECD 112, OECD 117, OECD 201, OECD 105)

Testele de toxicitate acută efectuate în conformitate cu OECD 202, la *Daphnia magna* expusă la florfenicol, la concentrații de până la 330 mg / l (LeLievre, 1991a) au permis determinarea valorilor EC50 și NOEC (Tabelul 2.13)

Tabelul 2.13 Toxicitatea acută a florfenicolului și a metabolitilor majori la *Daphnia magna*

Parametru	Florfenicol	Metabolitii florfenicolului		
		Amina	Alcoolul	Acidul oxamic
EC50 (mg/l)	>330	>18	>14	>24
NOEC (mg/L)	<100	18	8.9	24
Referinta	LeLievre (1991a)	LeLievre (1991b)	LeLievre (1991c)	LeLievre (1991d)

PNEC apă determinat este prezentat în Tabelul 2.14.

Tabel 2.14. PNEC apă Florfenicol

Specie	Parametru evaluare/ valoare EC ₅₀ or LC ₅₀ (mg/l)	FA VICH	PNEC (mg/l)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	>780	100	7.8
<i>Lepomis macrochirus</i>	>830	100	8.3
<i>Daphnia magna</i>	>330	100	3.3
<i>Navicula pelliculosa</i>	61	10	6.1
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	1	10	0.1
<i>Lemna gibba</i>	0.76	10	0.076
<i>Anabaena flos-aquae</i>	0.23	10	0.023

[168,169]

Valorile de toxicitate variază, peștele (*O. mykiss* și *L. macrochirus*) având cele mai mari valori acute raportate, mai mari de 780 și 830 mg / l, respectiv *A. flos-aquae* având valoarea cea mai mică, de 0,23 mg / l. Această din urmă valoare indică faptul că cianobacteria de apă dulce, *A. flos-aquae*, este cea mai sensibilă specie de apă dulce pentru care sunt disponibile date de evaluare Faza II, Treapta A.

Studiile asupra plantelor terestre au examinat atât apariția răsadurilor cât și creșterea. Acesta din urmă a reprezentat obiectivul mai sensibil, astfel încât PNEC-urile sunt derivate pe baza datelor privind creșterea (greutate umedă). PNEC (raportul dintre valorile de toxicitate și AF) pentru organismele terestre variază de la 0,005 mg / kg pentru *caltunas* până la 0,156 mg / kg pentru *râme*. (Tabel 2.15).

Tabel 2.15 PNEC-urile pentru nevertebrate și plante terestre florfenicol

Specie	Parametru/valoare (mg/kg)	FA VICH	PNEC (mg/kg)
<i>Râme (reproducere)</i>	NOEC: 1.56	10	0.156
<i>Căltunaș</i>	EC50: 0.5	100	0.005
<i>Muștar</i>	EC50: 1.7	100	0.017
<i>Grâu weight</i>	EC50: 6.7	100	0.067
<i>Căltunaș</i>	EC50 > 1	100	>0.01
<i>Varză</i>	EC50: 0.859	100	0.009
<i>Muștar</i>	EC50: 0.705	100	0.007

[168,169]

S-a luat în considerare în calculele următoare cea mai sensibilă valoare de toxicitate:

Alge 96 h, EC50 = 0,23 mg/l, AF = 10, **PNEC_{apă} = 0,023 mg/l**

Calculul PNEC sol și PNEC sediment luând în considerare PNEC_{capă} (determinat din rezultatul efectelor determinate experimental), se efectuează utilizând EPM (metoda de partitionare echilibrată), conform relațiilor 1.1 și 1.2. Au rezultat $PNEC_{sol} = 0,01016 \text{ mg/kg}$ și $PNEC_{sed} = 0,02718 \text{ mg/kg}$.

Pentru a putea estima efectele adverse asupra ecosistemelor solului, a fost realizată o analiza de risc. Pentru a determina riscul (R), PEC-urile determinate inițial sunt raportate la PNEC-urile determinate din datele de ecotoxicitate ($R = PEC / PNEC$) (Tabel 2.16).

Tabel 2.16. Riscul (R) Florfenicol

Parametru Specia și categoria	R _{inisol}	R _{iniapăfreatică}	R _{iniapăsupraf}	R _{inisediment}
broileri	87,2	32	29	61,84
găini	19,29	7,08	6,39	13,68
suine	11,9	4,34	3,95	8,46

Valorile riscului pentru mediu, $R > 1$, pentru toate speciile fac ca evaluarea să continue cu rafinarea PEC-urilor bazata pe metabolism (fracția de doza considerată activă este 0,5), pe degradarea în dejecții și în sol, rafinare efectuată conform prevederilor ghidului EMEA (Tabel 2.17).

Tabel 2.17. Riscului rafinat (R_{raf}) Florfenicol

Parametru Specia și categoria	R _{metabolism}	R _{degradare în dejecții}	R _{degradare în sol (după 2 răspândiri)}
broileri	43,6	1,37	1,37
găini	9,64	0,004	0,004
suine	5,90	0,06	0,06

Deoarece valorile riscului rafinat pentru mediu se menține R_{raf} > 1 și după rafinarea PEC-urilor, pentru specia broileri, evaluarea continuă în **Faza II Treapta B** cu perfecționarea PNEC-urilor.

Caracterizarea riscului de treapta B ia în considerare efectele cronice, asupra organismelor acvatice și terestre. PNEC-urile, sunt calculate pe baza datelor de ecotoxicitate disponibile și factorilor corespunzători de evaluare.

Efectele acvatice, calcul PNEC

Date privind efectele acvatice de treapta B sunt disponibile pentru trei niveluri trofice: plantele acvatice, nevertebratele și pesti. Studiile de inhibare a creșterii algelor și cianobacteriene care au fost realizate [168] pot fi utilizate pentru a evalua efectele cronice, la nivelul B comparativ cu efecte acute la nivelul A. Pentru nevertebrate, sunt disponibile date dintr-un studiu al ciclului de viață Daphnia [169], un studiu de reproducere a rotiferelor și un studiu de 28 de zile, benthic midge. Pentru pesti, un studiu la etapa de început a vieții oferă date pentru evaluarea de nivel B. Dacă a fost disponibilă mai mult de o valoare de toxicitate, a fost selectată cea mai mică valoare (indicând cea mai mare toxicitate) (Tabel 2.18).

Tabel 2.18. PNEC_{capă} rafinat, florfenicol Treapta B [168,169]

Specie și Referința	Toxicitate punct final	Valoare toxicitate (mg/l)	AF VICH	PNEC _{capă} rafinat (mg/l)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	NOEC, 96-h	0.75	10	0.075
<i>Lemna gibba</i>	NOEC, 7zile	0.39	10	0.039
<i>Navicula pelliculosa</i>	EC10, 72h	18.7	10	1.87
<i>Anabaena flos-aquae</i>	NOEC, 96-h	0.11	10	0.011
<i>Daphnia magna</i>	NOEC, 21zile	1.5	10	0.15
<i>Brachionus calyciflorus</i>	NOEC, 2zile	0.76	10	0.076
<i>Pimephales promelas</i>	NOEC, stadiul timpuriu al vieții	5.5	10	0.55

Efectele terestre, calcul PNEC

Conform ghidului EMEA, studiile privind efectele terestre la nivelul B includ studii de transformare a azotului extins la 100 de zile și teste de creștere a plantelor terestre. Datele disponibile privind toxicitatea florfenicolului care îndeplinesc aceste cerințe sunt prezentate mai jos. Studiul privind caltunasul, de Bealing și colab. (1999), a constatat că efectul cel mai sensibil măsurat a fost pe cea mai lungă frunză a perechilor de frunze primare și secundare, iar NOEC bazat pe acest efect a fost de 0,16 mg / kg. Studiul efectuat de Gray (2007) a furnizat valori NOEC pentru varză și mustar pe baza greutateii, care a fost cel mai sensibil efect final (Tabel 2.19, Tabel 2.20).

Tabel 2.19 PNEC sol (pentru organismele terestre) rafinat – florfenicol treapta B [168,169]

specie și Referința	Toxicitate punct final	Valoare toxicitate (mg/kg)	AF VICH	PNECsol rafinat (mg/kg)
<i>Caltunas</i>	NOEC creștere	0.16	10	0.016
<i>Varza</i>	NOEC greutate	0.123	10	0.0123
<i>Mustar</i>	<i>NOEC greutate</i>	<i>0.123</i>	<i>10</i>	<i>0.0123</i>

Tabel 2.20. PNEC sediment (organisme sediment) rafinat - treapta B – florfenicol treapta B [168,169]

Specie și Referința	Toxicitate punct final	Valoare toxicitate (mg/kg)	AF VICH	PNECsediment rafinat (mg/kg)
<i>Chironomus riparius</i>	<i>NOEC, 28-d</i>	<i>25</i>	<i>10</i>	<i>2.5</i>

Acolo unde a fost disponibilă mai mult de o valoare de toxicitate, a fost selectată cea mai mică valoare (indicând cea mai mare toxicitate).

Evaluarea riscului rafinat Treapta B (PECrafinat / PNECrafinat)

PEC-urile rafinate, calculate pe baza degradării în dejecții și ținând seama de factorul de metabolizare Fa ($PEC_{degradare\ în\ dejecții} \times Fa$), sunt comparate cu PNEC-urile rafinate de nivel B, derivate din valorile de toxicitate și factorii de evaluare folosiți la nivelul B pentru a determina Riscul (Raf) Treapta B pentru fiecare specie tratată (Tabelul 2.21, 2.22, 2.23).

Tabelul 2.21 Rrafinat suine

Compartimentul	PEC rafinat mg/l, mg/kg	Toxicitate	PNECrafinat mg/l, mg/kg	Rrafinat
Apă	0,0007	<i>Anabaena flos-aquae</i> (Gallagher et al., 2008a) NOEC 0,11, AF=10	0,011	0,06
Sol	0,0007	Mustar (Gray, 2007) NOEC 0,123, AF=10	0,0123	0,05
Sediment	0,0007	<i>Chironomus riparius</i> (Bradley, 2009) NOEC 25, AF=10	2,5	0,0003

Tabelul 2.22 Rrafinat broileri

Compartimentul	PEC rafinat mg/l, mg/kg	Toxicitate	PNECrafinat mg/l, mg/kg	Rrafinat
Apă	0,0007	<i>Anabaena flos-aquae</i> (Gallagher et al., 2008a) NOEC 0,11, AF=10	0,011	0,63
Sol	0,0007	Mustar (Gray, 2007) NOEC 0,123, AF=10	0,0123	0,56
Sediment	0,0007	<i>Chironomus riparius</i> (Bradley, 2009) NOEC 25, AF=10	2,5	0,003

Tabelul 2.23 Rrafinat găini

Compartimentul	PEC rafinat mg/l, mg/kg	Toxicitate	PNECrafinat mg/l, mg/kg	Rrafinat
Apă	0,00006	<i>Anabaena flos-aquae</i> (Gallagher et al., 2008a) NOEC 0,11, AF=10	0,011	0,005
Sol	0,00006	Mustar (Gray, 2007) NOEC 0,123, AF=10	0,0123	0,005
Sediment	0,00006	<i>Chironomus riparius</i> (Bradley, 2009) NOEC 25, AF=10	2,5	0,00002

Riscul rafionat (Raf) Treapta B pentru fiecare compartiment de mediu este prezentat în Tabelul 2.24

Tabel 2.24 Riscul (Raf) Treapta B Florfenicol

Parametru	R _{raf sol}	R _{raf apă}	R _{raf sediment}
Specia și categoria			
broileri	0,63	0,56	0,003
găini	0,005	0,005	0,00002
suine	0,06	0,05	0,0003

Coefficienții de risc treapta B calculați au fost ≤ 1 pentru toate speciile indicate în cele trei compartimente de mediu: apă, sol, sediment. Din analiza impactului asupra mediului a produsului FLORFENICOL FP 10% soluție orală pentru găini (broileri, tineret înlocuire) și suine rezultă că nici un risc nu ar fi asupra speciilor ecosistemului.

Activitatea florfenicolului asupra microorganismelor procariote nu este de neglijat: concentrația minimă inhibitoare (MIC) pentru *Pasteurella multocida* este de 0,25 mg/l, pentru *Trichoderme viride* și *Aspergillus niger* este de peste 1 mg/l, pentru *Nitrobacter sp.* este de 65 mg/l iar pentru *Nitrosomonas europaea* este de 2,5 mg/l [91-99].

2.5. Evaluarea analitică a riscului de mediu pentru lincomicină și spectinomicină

Produsul *LIN-SPE-MIX 880* - pulbere hidrosolubilă pentru suine și broileri, are ca substanța activă lincomicina (sub formă de lincomycin hydrochloride) și spectinomicina (sub formă de spectinomycin dihydrochloride pentahydrate). Produsul conține 293mg/g lincomicina, 293mg/g spectinomicina. Lincomicina este un antibiotic lincosamic obținut din *Streptomyces lincolnensis*, activă împotriva bacteriilor gram-pozitive, a unor bacterii anaerobe gram-negative și a *Mycoplasma spp.* Spectinomicina este un antibiotic aminociclitol obținut din *Streptomyces spectabilis*; activă împotriva unor bacterii gram-negative aerobe, a unor coci gram-pozitivi și a *Mycoplasma spp.*

LIN-SPE-MIX 880 se elimină prin urină și fecale fie în formă neschimbată, fie sub o formă inactivă microbiologică, circa $\frac{3}{4}$ din doză, în decurs de 6 ore de la administrare. Lincomicina suferă un metabolism hepatic și se excretă în bilă și urină (Aiello, 1998). Spectinomicina este excretată în cea mai mare parte,

nemodificata, în fecale și urină (Aiello, 1998). Se administrează 5,5 mg lincomicina și 5,5 mg spectinomycină/kg greutate corporală la suine și 8,8 mg lincomicina și 8,8 mg spectinomycină /kg greutate corporală la broileri, pe o durată de 7 zile. Excretele care rezultă sunt depozitate și aplicate pe sol într-o etapă ulterioară. Concentrațiile rezultate în aceste compartimente de mediu, vor fi determinate de proprietățile fizico-chimice ale substanței active, de partitionarea sa în sol și sedimente, de degradarea abiotică și biotică de degradarea substanței active în dejectiile lichide și solide și de caracteristicile de mediu (inclusiv tipul de sol, condițiile climatice).

Se calculează PEC_{sol} inițial (conform ghidului EMEA) pentru fiecare specie țintă și fiecare substanță activă. (Tabel 2.25, 2.26).

Tabel 2.25. PEC_{sol}, apă freatică, apă de suprafață și sediment inițial lincomicină

Parametru Specia și categoria	PEC _{sol} [mg/kg]	PEC _{apăfreatică} [mg/l]	PEC _{apăsuprafață} [mg/l]	PEC _{sediment} [mg/kg]
suine intensiv	0,334	0,106	0,096	0,437
broileri intensiv	0,063	0,020	0,018	0,083

Tabel 2.26. PEC_{sol}, apă freatică, apă de suprafață și sediment inițial spectinomycină

Parametru Specia și categoria	PEC _{sol} [mg/kg]	PEC _{apăfreatică} [mg/l]	PEC _{apăsuprafață} [mg/l]	PEC _{sediment} [mg/kg]
suine intensiv	0,334	0,011	0,010	0,329
broileri intensiv	0,063	0,002	0,002	0,022

Calcularea PEC_{sol} inițial total pentru LIN-SPE-MIX 880 a fost efectuată prin însumarea PEC sol inițial pentru cele două substanțe active luând în considerare rezultatele cele mai nefavorabile, obținute pe specia suine.

Calcularea PEC_{apa} total (freatică și de suprafață) pentru LIN-SPE-MIX 880 se efectuează prin însumarea PEC apă (freatică și de suprafață) pentru cele două substanțe active (lincomicina și spectinomycină) luând în considerare rezultatele cele mai nefavorabile, obținute pe specia suine.

PEC_{apa} freatică total LIN-SPE-MIX 880 = 0,118 mg/l

PEC_{apa} de suprafață total LIN-SPE-MIX 880 = 0,106 mg/l

PEC_{apa} sediment total LIN-SPE-MIX 880 = 0,767 mg/kg

Întrucât valoarea PEC_{sol} inițial pentru specia țintă suine este mai mare de 0,1 mg/kg, evaluarea riscului pentru mediu trebuie să continue în Faza II, treapta A.

Formula moleculară a levamisolului clorhidrat este C₁₈H₃₅ClN₂O₆S iar formula structurală (2S,4R)-N-[(1R,2R)-2-hydroxy-1-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-methylsulfonyloxan-2-yl]propyl]-1-methyl-4-propylpyrrolidine-2-carboxamide;hydrochloride, este prezentată în Figura 2.4.

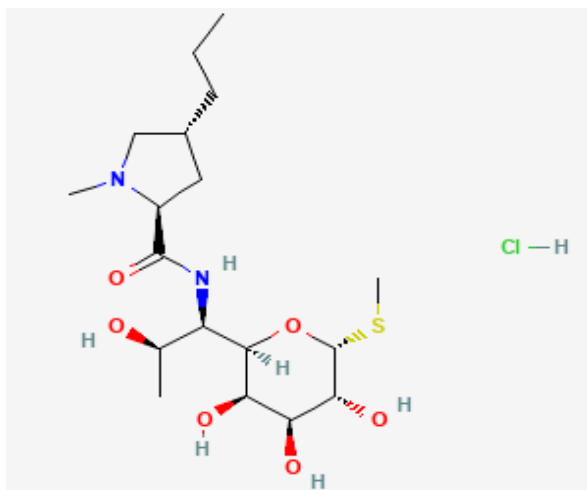


Figura 2.4. Structura lincomicină clorhidrat [180]

Formula moleculară a spectinomiceii diclorhidrat pentahidrat este $C_{14}H_{36}Cl_2N_2O_{12}$ iar formula structurală (1R,3S,5R,8R,10R,11S,12S,13R,14S)-8,12,14-trihydroxy-5-methyl-11,13-bis(methylamino)-2,4,9-trioxatricyclo[8.4.0.03,8]tetradecan-7-one;pentahydrate;dihydrochloride (2S,4R)-N-[(1R,2R)-2-hydroxy-1-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-methylsulfonyloxan-2-yl]propyl]-1-methyl-4-propylpyrrolidine-2-carboxamide;hydrochloride), este prezentată în Figura 2.5.

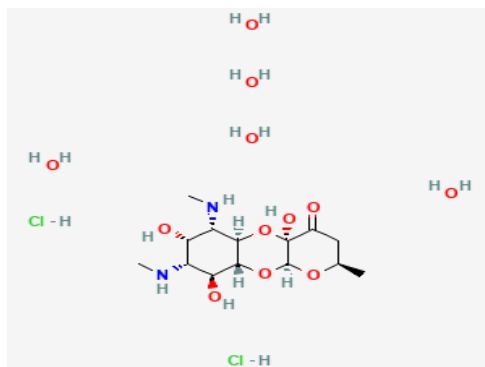


Figura 2.5. Structura spectinomiceii diclorhidrat pentahidrat [181]

În Faza II treapta A. se evaluează potențialul produsului LIN-SPE-MIX 880 de a afecta organismele din mediu acvatic și terestru.

Dacă sunt expuse la lumina zilei, lincomicina și spectomicina pot suferi fotoliză la interfața sol-atmosferă și la suprafața dejectiilor. Timpul mediu necesar pentru disiparea a 50% lincomicină a fost de 31 zile. Lincomicina se încadrează astfel la substanțele moderat persistente în sol.

Lincomicina este suficient de stabilă în timpul depozitării dejectiilor, astfel încât aceasta să fie prezentă atunci când acestea sunt aplicate pe culturi sau pe pășuni ca sursă de nutrienți pentru plante. Monitorizarea concentrațiilor de lincomicină în solurile modificate cu dejectii a demonstrat că acest antimicrobian poate persista la distanțe mai mari de 5 cm de sol timp de mai multe luni după aplicare.

Datele disponibile despre lincomicină și streptomycină folosite în evaluarea de risc de mediu sunt prezentate în Tabelul 2.27, 2.28.

Tabel 2.27. Parametrii de evaluare risc de mediu lincomicină

Proprietate	Parametru	Valoare parametru
Fizico-chimice	Solubilitate în apă	900 mg/l
	Punct de topire	148°C
	Presiune de vapori	0,06 Pa
Mobilitate în sol	Koc	59 l/kg
Persistența în sol	DT 50 (zile)	31
Bioacumulare	Log Kow	0,56

National Library of Medicine PubChem

Tabel 2.28. Parametrii de evaluare risc de mediu spectinomicină

Proprietate	Parametru	Valoare parametru
Fizico-chimice	Solubilitate în apă	100 mg/l
	Presiune de vapori	0,06 Pa
Mobilitate în sol	Koc	580 l/kg
Persistența în sol	DT 50 (zile)	-
Bioacumulare	Log Kow	0,82

National Library of Medicine PubChem

Spectinomocina nu persista în sol, nu există posibilitatea acumulării în mediu. Pentru lincomicina și spectinomocina, potențialul bioacumulativ este mic.

Valorile de toxicitate experimentală disponibile și predictibile au indicat faptul că toxicitatea lincomicinei și spectinomocinei la organismele acvatice și terestre este scăzută.

PNEC apă determinat din valorile de ecotoxicitate disponibile pentru lincomicină și spectinomocină și factorul corespunzător de evaluare, este prezentat în Tabelul 2.27, 2.28.

Tabel 2.27 PNEC apă lincomicină

Specie	Parametru / valoare mg/L	FA VICH	PNEC (mg/l)
Pesti 96 ore (<i>Lepomis macrochirus</i> - <i>Bluegill Sunfish</i>)	LC ₅₀ = 980	1000	0,98
Alge (<i>Ceriodaphnia</i>)	EC ₅₀ = 721	1000	0,721

(OECD 202, OECD 203)

Tabel 2.28 PNEC apă spectinomocină

Specie	Parametru / valoare mg/L	FA VICH	PNEC (mg/l)
Pesti 96 ore (<i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Rainbow Trout</i>)	LC ₅₀ = 118	1000	0,118
Crustacea (<i>Daphnia magna</i>) 48 ore	EC ₅₀ = 1000	1000	1
<i>S. capricornutum</i> (green alga), 72 ore	EC ₅₀ =1,18	1000	0,00118

(OECD 202, OECD 203)

Spectinomocina care are stabilitate redusă în dejectiile stocate nu a fost detectată în dejectiile aplicate culturilor sau pajistilor. În consecință, nu a fost detectată în solul tratat cu îngrășăminte.

S-a luat în considerare în calculele următoare cea mai sensibilă valoare de toxicitate:

Alge PNEC apă lincomicina = PNEC *Ceriodaphnia* = 0,721 mg/l

Calculul PNEC sol și PNEC sediment luând în considerare PNEC apă (determinat din rezultatul efectelor determinate experimental), se efectuează utilizând EPM (metoda de partitionare echilibrată), conform relațiilor 1.1 și 1.2. Au rezultat ***PNEC_{sol} = 0,834 mg/kg*** și ***PNEC_{sed} = 1,485 mg/kg***.

Pentru a putea estima efectele adverse asupra ecosistemelor solului, a fost realizată o analiză de risc. Pentru a determina riscul (R), PEC-urile inițial determinate sunt comparate cu PNEC-ul calculat din datele disponibile de ecotoxicitate ($R = PEC / PNEC$) pentru specia suine. (Tabel 2.29)

Tabel 2.29. Riscul lincomicinei, R

Parametru Specia și categoria	R _{inisol}	R _{iniapăfreatică}	R _{iniapăsupraf}	R _{inisediment}
suine	0.79	0,16	0.14	0,51

Valorile riscului pentru mediu foarte mici ($R < 1$), pentru toate speciile fac ca evaluarea să se oprească aici și rezultă că produsul medicinal veterinar nu ar prezenta nici un risc asupra ecosistemului [100 - 123].

2.6. Diseminarea cercetărilor de evaluare a impactului asupra mediului al medicamentelor veterinare

Metoda software de evaluare a impactului asupra mediului a fost efectuată pe baza unor algoritmi proprii de calcul care au fost obiectul unor lucrări științifice publicate în revista producătorilor de medicamente de uz veterinar din România, “Medicamentul Veterinar”, cotate BDI [148 – 149].

Am efectuat cercetări privind analiza transferului levamisolului, tiamulinului în țesutul animal după administrare pe cale orală, factor important pentru asigurarea siguranței alimentelor și a protecției mediului, în scopul elaborării metodelor HPLC-MS/MS pentru determinarea reziduurilor de tiamulin, levamisol.

Am efectuat cercetări pentru evaluarea impactului asupra mediului al penicilinei G prin metoda analitică, metoda software și am elaborat în colaborare cu Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Protecția Mediului, metoda SPE-Online-UHPLC-MS/MS pentru determinarea penicilinei G din apele de suprafață.

Aceste cercetări au fost publicate în articole din reviste de specialitate cotate ISI, de nivel Q1, Q2.

CAPITOLUL 3 ALGORITMI DE CALCUL ÎN ANALIZA RISCULUI DE MEDIU

3.1. Algoritm general de calcul

Pentru evaluarea riscului pentru mediu a substanțelor active prezente în PMV, a fost întocmit un algoritm propriu de calcul care a stat la baza elaborării unui soft-ware original și interactiv specializat, care să permită determinarea precisă și într-un timp scurt a impactului substanței active asupra factorilor de mediu: sol, apă, sediment.

Algoritm general de calcul integrează toate etapele parcurse conform cerințelor ghidului EMEA de la determinarea concentrațiilor predictibile inițiale în sol (PEC-urile initiale calculate pe baza abordării reziduului total), al concentrațiilor predictibile în apă (PEC-urile initiale calculate în apă, sediment), al concentrațiilor predictibile în mediu recalulate pe baza tipului de excreție, metabolismului substanțelor active, pe baza degradării substanțelor active în sol și dejecții, al concentrațiilor predictibile fără efect, PNEC, pentru fiecare specie tratată cu produsul medicinal veterinar, pentru toate compartimentele de mediu, sol, apă subterană, apă de suprafață, sediment până la stabilirea riscului initial R și rafinat, R_{raf} , Faza II Treapta A.

În ghidul EMEA relațiile sunt grupate după diverse criterii în diferite capitole dar nu într-o succesiune necesară evaluării conform celor doua faze. Algoritm original redă succesiunea logică a tuturor pașilor care trebuie parcurși în scopul calculului tuturor parametrilor necesari pentru finalizarea evaluării (Figura 3.1).

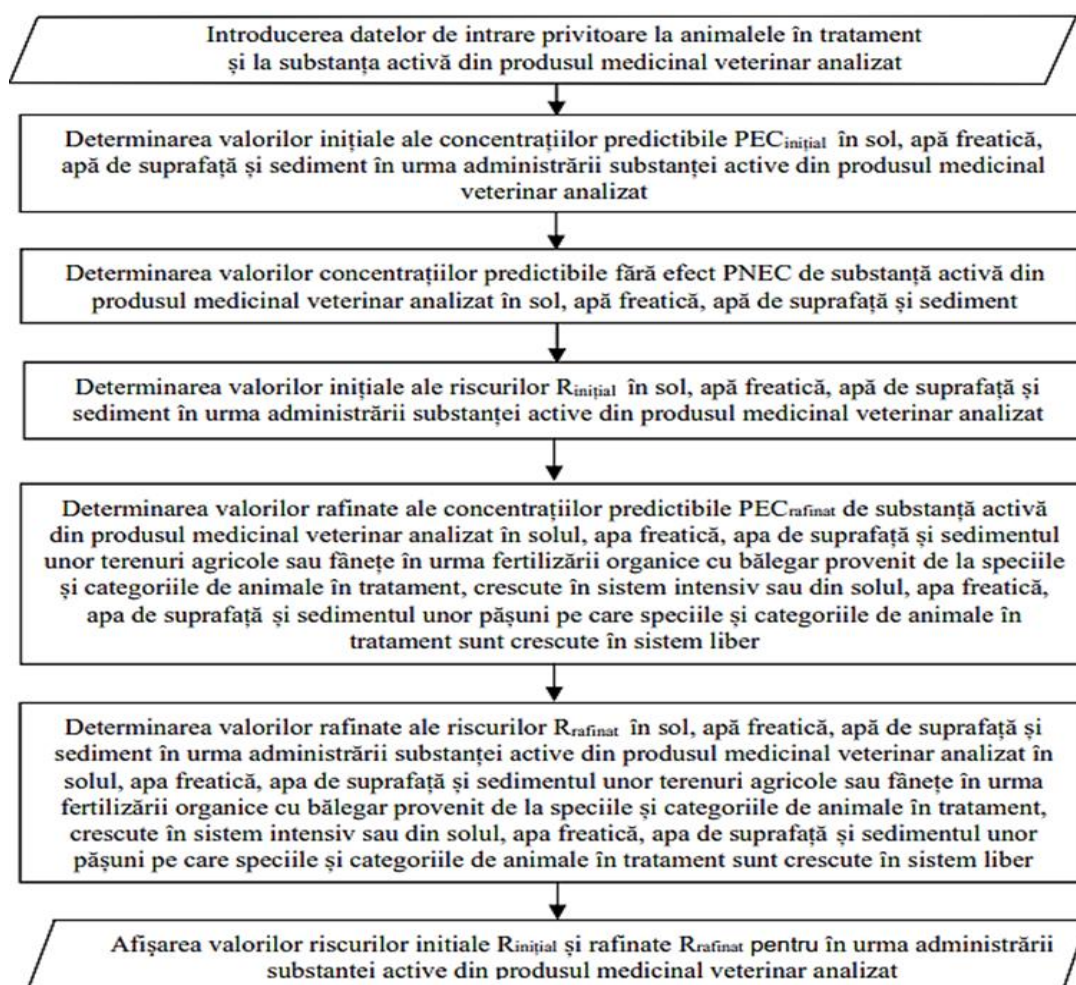


Figura 3.1. Algoritm general de calcul

În schemele structurale ale algoritmilor de calcul, paralelogramele reprezintă blocuri de intrare date sau ieșire date, dreptunghiurile sunt pașii algoritmului, iar romburile sunt blocurile logice.

CAPITOLUL 4

METODA SOFTWARE ÎN ANALIZA RISCULUI DE MEDIU

4.1. Descrierea metodei software

Având finalizat algoritmul propriu de calcul, prezentat în capitolul anterior, pentru evaluarea riscului de mediu, am elaborat unui soft-ware original interactiv care:

- este foarte ușor și comod de operat permițând introducerea cu ușurință a tuturor datelor privitoare la produsul medicinal veterinar analizat și la animalele în tratament;
- urmează și explicitează concret pașii algoritmului de calcul având înglobate toate datele din ghid necesare evaluării, nemaifiind necesară consultarea acestuia în timpul analizei;
- conține mai multe variante de calcul a unor parametri permițând alegerea variantei celei mai corespunzătoare;
- permite evaluatorilor de mediu efectuarea unor analize de risc de mediu deosebit de minuțioase în perioade extrem de reduse de timp;

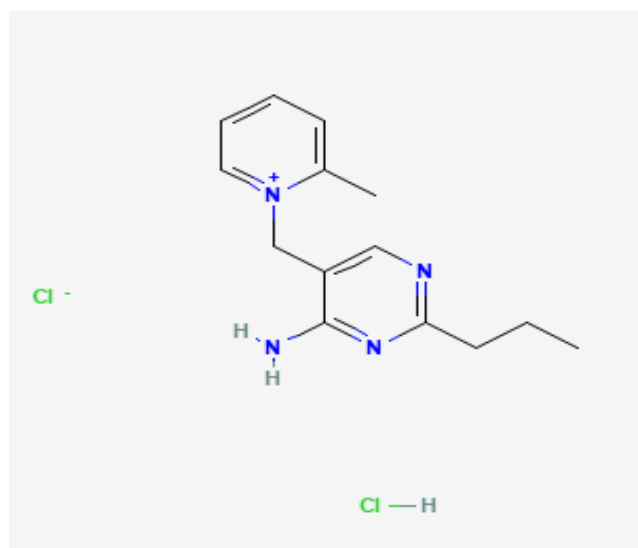
După introducerea tuturor datelor specifice produsului, conform indicațiilor de administrare și datelor specifice substanțelor active din produs, sunt afișate valorile tuturor parametrilor necesari evaluării.

Softul a fost creat în programul MATHCAD, versiunea 16 și actualizat pentru versiunile curente MATHCAD PRIME.

Am selectat să prezint ca aplicații ale metodei software, două evaluări de impact asupra mediului efectuate pentru substanțele active *amprolium* și *penicilina G*.

4.2. Evaluarea riscului de mediu pentru amprolium

Evaluarea riscului de mediu este o evaluare a expunerii și a efectelor amproliumului dintr-un produs farmaceutic veterinar sub formă de premix care conține 250 mg/g și se administrează la găini, broileri (15,62 mg amprolium /kg greutate corporală/zi, în 7 zile consecutive) și la curcani (31,25 mg amprolium /kg greutate corporală/zi, în 7 zile consecutive).



Formula structurală a substanței amprolium

(5-[(2-methylpyridin-1-ium-1-yl)methyl]-2-propylpyrimidin-4-amine;chloride;hydrochloride) este prezentată în Figura 4.1.

Formula moleculară este $C_{14}H_{20}Cl_2N_4$

Figura 4.1.Structura amproliumului [182]

Amprolium este un agent anticoccidic care acționează ca inhibitor competitiv al tiaminei în metabolismul parazitului și interferează cu metabolismul necesităților de glucide pentru multiplicarea și supraviețuirea coccidiană. Se recomandă în controlul și tratamentul eimeriozei (coccidiozei) produsă de *Eimeria spp.*

4.2.1. Evaluarea analitică a riscului de mediu pentru amprolium

Calculul PEC (Analiza expunerii)

Evaluarea expunerii s-a făcut pe abordarea reziduiului total. S-a luat în calcul cantitatea totală a dozei aplicate, excretată de animalul tratat, fără datele despre metabolism. Rezultatele obținute pentru fiecare specie au fost:

- PECsol inițial broiler = 969,798 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- PECsol inițial găini outoare = 113, 297 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- PECsol inițial găini înlocuire = 214,792 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- PECsol inițial curcani = 966,875 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- PECsol inițial cumulat = 2265 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Întrucit valorile PECsol inițial pentru fiecare specie tinta sunt mai mari de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, evaluarea riscului pentru mediu continuă în faza II.

Va fi utilizată în calculele următoare valoare PEC sol inițial cumulat de la toate categoriile de păsări.

Calculul PECwater, PECsediment

S-au calculat concentrațiile predictibile de penicilina G în apa freatică (PECapă freatică), apa de suprafață (PECapă de suprafață) și în sediment (PECsediment), ținând cont de masa molară (MW= 315,24), solubilitatea în apă (SOL = 540,32 mg/l), presiunea de vapori (VP = 0,06 Pa) și coeficientul de distribuție apă – carbon organic (Koc = 1,006 l/kg) (Tabel 4.1).

Tabel 4.1. Concentrațiile predictibile de amprolium calculate în sol, apă freatică, apă de suprafață și sediment.

Concentrație predictibilă	Amprolium
sol	2265 $\mu\text{g}/\text{kg}$
apă freatică	4182 $\mu\text{g}/\text{l}$
apă de suprafață	5575 $\mu\text{g}/\text{l}$
sediment	20630 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Calculul PNEC (Analiza efectului)

Concentrația predictibilă fără efect (PNEC), concentrația penicilinei G care marchează limita la care mai jos nu sunt măsurate efectele negative ale expunerii într-un ecosistem, s-a calculat cu ajutorul datelor de ecotoxicitate disponibile în literatură. În funcție de tipul de date utilizate, factorul de evaluare a fost utilizat pentru a ține cont de încrederea datelor de toxicitate care sunt extrapolate la un întreg ecosistem (Tabel 4. 2).

Tabel 4. 2 Concentrația estimată fără efect (PNEC)

Compartiment	Descriptori de ecotoxicitate	FA	PNEC
apa	NOECalge: 88,4 mg/l	10	8,84 mg/l
sediment	NOEC: 89,4 mg/kg	10	8,94 mg/kg
sol	NOECviermi : 88,4 mg/kg	10	8,84 mg/kg

Pentru a determina riscul pentru mediul acvatic am selectat valoarea cea mai mică de toxicitate (PNEC *Anabaena flos-aquae* = 8,84 mg/l).

În cazul de mai sus, concentrația predictibilă fără efect în apă (PNECapă) calculată este 8,84 mg/l. Prin metoda factorului de evaluare, concentrația predictibilă fără efect în sol (PNECsol) calculată este 8,84 mg/kg iar concentrația predictibilă fără efect în sediment (PNECsediment) calculată este 8,94 mg/kg.

Calculul Rsol, apă freatică, apă de suprafață, sediment (Analiza riscului)

PEC-urile calculate initial sunt raportate la PNEC-urile calculate anterior pentru a stabili riscul inițial. (Tabel 4.3).

Tabel 4.3 . Riscul inițial cumulat (Rinițial cumulat) al amproliumului:

Compartiment	PECcumulat	PNEC	Rinițial cumulat
sol	2,265 mg/l	8,84 mg/kg	0,256
apa freatică/apa de suprafață	4,182 /5,575 mg/l	8,84 mg/l	0,473 / 0,631
sediment	20,630 mg/kg	8,94 mg/kg	2,308

Valorile obținute pentru PECcumulat sediment și PNEC sediment, conduc la un risc $R > 1$, și la o continuare a evaluării riscului cu rafinarea PEC-urilor.

Calculul PEC-urilor rafinate cumulate

Ajustările necesare pentru a prelucra PECurile sunt: rafinarea bazata pe metabolism, pe degradarea în dejecții și sol.

Considerând fracția de doză activă $Fa = 0,68$, s-au determinat PEC-urile rafinate pentru fiecare specie și PEC-ul rafinat cumulat ținând seama de metabolism (PECraf met cum).

În rafinarea PEC-urilor bazată pe degradarea în dejecții, se iau în calcul perioada de timp în care sunt depozitate dejecțiile și degradarea amproliumului în dejecții, $DT50$ (zile) > 8 (PECraf dej cum).

Se determină PEC degradare sol rafinat cumulat ținând cont de numărul de etape de raspândire a dejecțiilor pe suprafața agricolă (PEC deg sol raf cum).

Calculul riscurilor rafinate cumulate

PEC-urile rafinate cumulate, calculate pe baza metabolismului, degradării în dejectii, degradării în sol, sunt comparate cu PNEC-urile pentru a determina riscul rafinat cumulat (Tabel 4.4).

Tabel 4.4 . Riscul rafinat cumulat (Rraf cum) al amproliumului:

Compartiment	PECraf met cum	PECraf dej cum	PEC deg sol raf cum	Rraf cum
sol	1,54 mg/kg	0,124 mg/kg	0,120 mg/kg	0,028
apa freatică/ apa de suprafață	-	-	0,45 / 0,6 mg/l	0,05 mg/l / 0,068
sediment	-	-	2,22 mg/kg	0,248

Deoarece Rrafinat cumulat < 1 , nu este necesară continuarea evaluării riscului în treapta B.

4.2.2. Evaluarea riscului mediu pentru amprolium prin metoda software

Matricile concentrației predictibile în sol (PECsolinițiali), concentrației predictibile în apa freatica (PECapafreaticai), concentrației predictibile în ape de suprafață (PECapedesuprafatai) și concentrației predictibile în sediment (PECsedimenti), conțin rezultatele calculate pentru toate categoriile de pasări crescute intensiv (găini, broileri, curcani) și tratate cu produsul analizat, conform formulelor de calcul prevazute în ghid și prezente în software amprolium.

Rândurile matricilor reprezintă speciile de animale tratate iar coloanele categoriile din fiecare specie. În cazul amproliumului, rezultatele se găsesc pe rândul corespunzător păsărilor (al treilea) pentru categoriile broier, găini outoare, găini înlocuire și curcani (Figura 4.2).

$$\begin{array}{cc}
 \text{PECSolinitiali} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 969.798 & 113.297 & 214.792 & 0 & 966.875 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} & \text{PECapafreaticai} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1.791 \times 10^3 & 209.187 & 396.583 & 0 & 1.785 \times 10^3 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \\
 \text{a} & \text{b} \\
 \\
 \text{PECapedesuprafatai} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2.387 \times 10^3 & 278.916 & 528.778 & 0 & 2.38 \times 10^3 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} & \text{PECSedimenti} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 8.835 \times 10^3 & 1.032 \times 10^3 & 1.957 \times 10^3 & 0 & 8.808 \times 10^3 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \\
 \text{c} & \text{d}
 \end{array}$$

Figura 4. 2. Calcul matricial PEC - aspecte din soft
a. matricea PECSolinitiali, [μg/kg], b. matricea PECapafreaticai, [μg/l]
c. matricea PECapedesuprafatai, [μg/l], d. matricea PEC sedimenti, [μg/kg]

Softul permite selectarea valorii PEC pentru sol, apă freatică, ape de suprafață și sediment (maxim sau cumulat) care va fi utilizată în calculele următoare (Figura 4.3).

Va fi utilizată în calculele următoare valoarea PEC sol initial cumulat de la toate categoriile de păsări.

$$\begin{array}{ll}
 \text{PECSolinitialicum} := \sum_{i=0}^4 \sum_{j=0}^5 \text{PECSolinitiali}_{i,j} & \text{PECSolinitialicum} = 2.265 \times 10^3 \\
 \text{PECSolinitialimax} := \max(\text{PECSolinitiali}) & \text{PECSolinitialimax} = 969.798 \\
 \text{PECapedesuprafataicum} := \sum_{i=0}^4 \sum_{j=0}^5 \text{PECapedesuprafatai}_{i,j} & \text{PECapedesuprafataicum} = 5.575 \times 10^3 \\
 \text{PECapedesuprafataimax} := \max(\text{PECapedesuprafatai}) & \text{PECapedesuprafataimax} = 2.387 \times 10^3
 \end{array}$$

Figura 4.3. Selectare valoare PECapă – aspecte din soft

După introducerea tuturor valorilor semnificative, disponibile de ecotoxicitate ale amproliumului și condițiilor pentru metoda factorului de evaluare se afișează rezultatele pentru PNECapă = 8,84 mg/l, PNECsol = 8,84 mg/kg; PNEC sediment = 8,94 mg/l.

Evaluarea riscurilor inițiale pentru sol a amproliumului, cuantificată prin indicatorii Rsolinii, Rapăfreaticăi, Rapedesuprafatăi, Rsedimenti, sunt calculate pentru toate speciile și categoriile de animale crescute intensiv, conform formulelor de calcul prevăzute în ghid și prezente în software amprolium (Figura 4.4).

$$\begin{matrix}
 \mathbf{R}_{\text{solinii}} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.11 & 0.013 & 0.024 & 0 & 0.109 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} & \mathbf{R}_{\text{rapafreaticai}} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.203 & 0.024 & 0.045 & 0 & 0.202 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \\
 \text{a} & \text{b} \\
 \mathbf{R}_{\text{rapedesuprafatai}} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.27 & 0.032 & 0.06 & 0 & 0.269 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} & \mathbf{R}_{\text{sedimentii}} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.988 & 0.115 & 0.219 & 0 & 0.985 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \\
 \text{c} & \text{d}
 \end{matrix}$$

Figura 4.4 Calcul matricial – aspecte din soft
 a. matricea R_{solinii}, b. matricea Rapăfreatică
 c. matricea Rapedesuprafațăi, d. matricea R_{sedimentii}

Deoarece valoarea riscului cumulat în sediment este mai mare decât 1 (R_{sedimentcum} = 2,308), evaluarea continuă cu rafinare PEC-urilor.

Matricea concentrației PEC_{solrafmeti} [μg/kg] rafinate în sol la administrarea produsului analizat, pe baza modului în care este metabolizată doza de ingredient activ de către organismul animalelor. (Figura 4.5).

$$\begin{matrix}
 \mathbf{F}_{\text{ai}} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.68 & 0.68 & 0.68 & 0 & 0.68 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} & \mathbf{PEC}_{\text{solrafmeti}} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 659.463 & 77.042 & 146.059 & 0 & 657.475 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \\
 \text{a} & \text{b}
 \end{matrix}$$

Figura 4.5 PEC rafinat pe baza metabolismului
 a. matricea fracției din doza de ingredient activ b. matricea concentrației PEC_{solrafmeti}

Matricea concentrației PEC_{solrafdejtai} [μg/kg] rafinate în solul terenurilor arabile și PEC_{solrafdejfai} [μg/kg], în solul fânețelor la administrarea produsului analizat, pe baza degradării în dejecții a ingredientului activ, conform relațiilor 4.1 și 4.2 sunt arătate în Figura 4.6.

$$\text{PEC}_{\text{solrafdejtai}_{i,j}} := \frac{M_{i,j} \cdot \ln N \cdot 1000}{\rho_{\text{bsu}} \cdot 10000 \cdot \text{aps} \cdot N_{\text{si}_{i,j}}} \quad (4.1)$$

$$\text{PEC}_{\text{solrafdejfai}_{i,j}} := \frac{\text{PEC}_{\text{solrafdejtai}_{i,j}}}{N_{\text{a}}} \quad (4.2)$$

$$\begin{matrix}
 \mathbf{PEC}_{\text{solrafdejtai}} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 95.097 & 5.814 & 4.36 & 0 & 18.489 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} & \mathbf{PEC}_{\text{solrafdejfai}} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 47.548 & 2.907 & 2.18 & 0 & 9.245 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \\
 \text{a} & \text{b}
 \end{matrix}$$

Figura 4.6 PEC rafinat în sol pe baza degradării în dejecții
 a. PEC_{solrafdejtai} în solul terenurilor arabile b. PEC_{solrafdejfai} în solul fânețelor

Matricea concentrației PECapafreaticaraftai [$\mu\text{g/l}$] predictibile rafinate în apa freatică, a ingredientului activ de la administrarea produsului analizat, sub influența fertilizării organice a terenurilor arabile este prezentată în Figura 4.7.

$$\text{PECapafreaticaraftai}_{i,j} := \frac{\text{PECsolraftai20cm}_{i,j} \cdot \text{RHOsol}}{\text{Ksolapa} \cdot 1000} \quad \text{PECapafreaticaraftai} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 175.582 & 10.734 & 8.05 & 0 & 34.138 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Figura 4.7 PEC rafinat în apa freatică - terenuri arabile

Matricea concentrației predictibile rafinate în apa freatică, sub influența fertilizării organice a fânețelor (PECapafreaticaraffi) [$\mu\text{g/l}$] este prezentată în Figura 4.8.

$$\text{PECapafreaticaraffi}_{i,j} := \frac{\text{PECsolraffi20cm}_{i,j} \cdot \text{RHOsol}}{\text{Ksolapa} \cdot 1000} \quad \text{PECapafreaticaraffi} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 170.216 & 10.406 & 7.804 & 0 & 33.095 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Figura 4.8 PEC rafinat în apa freatică - fânețe

Matricea concentrației predictibile rafinate în apele de suprafață, sub influența fertilizării organice a terenurilor arabile (PECapedesuprafataraftai) și a fânețelor (PECapedesuprafataraffi) [$\mu\text{g/l}$] este prezentată în Figura 4.9 și 4.10

$$\text{PECapedesuprafataraftai}_{i,j} := \frac{\text{PECsolrafdejai}_{i,j} \cdot \text{RHOsol}}{\text{Ksolapa} \cdot 1000} \quad \text{PECapedesuprafataraftai} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 234.11 & 14.312 & 10.734 & 0 & 45.517 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Figura 4.9 PEC rafinat în apa de suprafață - terenuri arabile

$$\text{PECapedesuprafataraffi}_{i,j} := \frac{\text{PECsolrafdejfi}_{i,j} \cdot \text{RHOsol}}{\text{Ksolapa} \cdot 1000} \quad \text{PECapedesuprafataraffi} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 226.954 & 13.875 & 10.406 & 0 & 44.126 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Figura 4.10 PEC rafinat în apa de suprafață - fânețe

Matricea concentrației predictibile rafinate în sediment, sub influența fertilizării organice a terenurilor arabile (PECsedimentraftai [$\mu\text{g/kg}$]) și a fânețelor (PECsedimentraffi [$\mu\text{g/kg}$]) conform relației 4.3 și 4.4, este prezentată în Figura 4.11.

$$\text{PECsedimentraftai}_{i,j} := \frac{\text{Ksedimentapa} \cdot \text{PECapedesuprafataraftai}_{i,j} \cdot 1000 \cdot \text{CONVsediment}}{\text{RHOsediment}} \quad (4.3)$$

$$PEC_{\text{sedimentraffii}}_{i,j} := \frac{K_{\text{sedimentapa}} \cdot PEC_{\text{pedesuprafataraffi}}_{i,j} \cdot 1000 \cdot CONV_{\text{sediment}}}{RHO_{\text{sediment}}} \quad (4.4)$$

$$PEC_{\text{sedimentraffii}} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 839.867 & 51.344 & 38.508 & 0 & 163.293 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad PEC_{\text{sedimentraftai}} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 866.347 & 52.963 & 39.722 & 0 & 168.441 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Figura 4.11 Matricea concentrației predictibile rafinate în sediment

Evaluarea riscurilor rafinate pentru sol sub influența fertilizării organice a terenurilor arabile ($R_{\text{solraftai}}$) și fânețelor ($R_{\text{solraffii}}$), respectiv $R_{\text{solrafcum}}$ și $R_{\text{solrafmax}}$, calculați pe baza valorilor cumulate, respectiv maxime a concentrațiilor predictibile rafinate anterior este prezentată în Figura 4.12 și 4.13.

$$R_{\text{solraftai}}_{i,j} := \frac{PEC_{\text{solrafdejtai}}_{i,j}}{1000 \cdot PNEC_{\text{sol}}} \quad R_{\text{solraftai}} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.011 & 6.576 \times 10^{-4} & 4.932 \times 10^{-4} & 0 & 2.092 \times 10^{-3} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Figura 4.12 Riscurile rafinate pentru sol - terenuri arabile

$$R_{\text{solraffii}}_{i,j} := \frac{PEC_{\text{solrafdejfi}}_{i,j}}{1000 \cdot PNEC_{\text{sol}}} \quad R_{\text{solraffii}} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.01 & 6.375 \times 10^{-4} & 4.782 \times 10^{-4} & 0 & 2.028 \times 10^{-3} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Figura 4.13 Riscurile rafinate pentru sol – fânețe

Evaluarea riscurilor rafinate pentru apa freatică sub influența fertilizării organice a terenurilor arabile ($R_{\text{apafreraftai}}$) și fânețelor ($R_{\text{solraffii}}$) este prezentată în Figura 4.14 și 4.15.

$$R_{\text{apafreraftai}}_{i,j} := \frac{PEC_{\text{apafreaticaraftai}}_{i,j}}{1000 \cdot PNEC_{\text{apa}}} \quad R_{\text{apafreraftai}} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.02 & 1.214 \times 10^{-3} & 9.107 \times 10^{-4} & 0 & 3.862 \times 10^{-3} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Figura 4.14 Riscurile rafinate pentru apa freatică - terenuri arabile

$$R_{\text{apafreaffii}}_{i,j} := \frac{PEC_{\text{apafreaticaraffii}}_{i,j}}{1000 \cdot PNEC_{\text{apa}}} \quad R_{\text{apafreaffii}} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.019 & 1.177 \times 10^{-3} & 8.829 \times 10^{-4} & 0 & 3.744 \times 10^{-3} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Figura 4.15 Riscurile rafinate pentru apa freatică – fânețe

Evaluarea riscurilor rafinate pentru apa de suprafață sub influența fertilizării organice a terenurilor arabile (Rapesupraftai) și fânețelor (Rapesupraffi) este prezentată în Figura 4.16 și 4.17.

$$Rapesupraftai_{i,j} := \frac{PECapedesuprafataraftai_{i,j}}{1000 \cdot PNEC_{apa}}$$

$$Rapesupraftai = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.026 & 1.619 \times 10^{-3} & 1.214 \times 10^{-3} & 0 & 5.149 \times 10^{-3} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Figura 4.16 Riscurile rafinate pentru apa de suprafață - terenuri arabile

$$Rapesupraffi_{i,j} := \frac{PECapedesuprafataraffi_{i,j}}{1000 \cdot PNEC_{apa}}$$

$$Rapesupraffi = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.026 & 1.57 \times 10^{-3} & 1.177 \times 10^{-3} & 0 & 4.992 \times 10^{-3} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Figura 4.17 Riscurile rafinate pentru apa de suprafață - fânețe

Evaluarea riscurilor rafinate pentru sediment sub influența fertilizării organice a terenurilor arabile (Rsedraftai) și fânețelor (Rsedraffi) este prezentată în Figura 4.18 și 4.19.

$$Rsedraftai_{i,j} := \frac{PECsedimentraftai_{i,j}}{1000 \cdot PNEC_{sediment}}$$

$$Rsedraftai = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.097 & 5.924 \times 10^{-3} & 4.443 \times 10^{-3} & 0 & 0.019 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Figura 4.18 Riscurile rafinate pentru sediment - terenuri arabile

$$Rsedraffi_{i,j} := \frac{PECsedimentraffi_{i,j}}{1000 \cdot PNEC_{sediment}}$$

$$Rsedraffi = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.094 & 5.743 \times 10^{-3} & 4.307 \times 10^{-3} & 0 & 0.018 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Figura 4.19 Riscurile rafinate pentru sediment – fânețe

Deoarece toate valorile de risc cumulat în sol, apă, sediment sunt subunitare, evaluarea se oprește aici și se consideră că produsul nu prezintă nici un risc asupra mediului.

Listing-ul integral al software-ului de evaluare a impactului amproliumului asupra mediului este prezentat în **Anexa 1**.

Listing-ul integral al software-ului de evaluare a impactului penicilinei G asupra mediului este prezentat în **Anexa 2**.

CAPITOLUL 5

MONITORIZAREA PENICILINEI G DIN APELE DE SUPRAFAȚĂ PRIN SPE-ONLINE-UHPLC-MS/MS

În ultimele decenii, calitatea ecosistemelor acvatice a fost amenințată de nivelurile în creștere ale poluării, cauzate de emisia unor substanțe chimice. Decizia de punere în aplicare (UE) 2015/495 a Comisiei publicată în martie 2015 elaborează o „listă de supraveghere” a compușilor care urmează să fie monitorizați la nivel european printre care și antibioticele.

În această teză de doctorat, a fost dezvoltată o metodologie bazată pe extracția în fază solidă online (SPE) cromatografie lichidă de ultra-înaltă performanță cuplată la un spectrometru de masă cu triplu cvadrupol (UHPLC-MS/MS) pentru determinarea simultană a mai multor compuși, prezenți în medicamentele veterinare, dintre care am selectat penicilina G. Metoda propusă oferă avantaje față de metodele deja disponibile, cum ar fi versatilitatea (mai mulți compuși pot fi analizați simultan), timp mai scurt necesar pentru analiză, robustețe și sensibilitate. Utilizarea pregătirii online a probelor a minimizat manipularea probei, a redus volumul eșantionului necesar și timpul necesar analizei, făcând astfel analiza rapidă și fiabilă. Metoda a fost validată cu succes în apele de suprafață și în apele uzate influente și efluente, cu limite de detectare la nivel de nanograme pe litru. Metoda dezvoltată în acest studiu pentru identificarea și dozarea reziduurilor de produse farmaceutice în matrice din apa de suprafață nu identifică și produșii de degradare care pot apare în special în procese de epurare, în stațiile de epurare a apelor uzate.

5.1. Prelevarea și pregătirea probelor de apă.

Identificarea și dozarea Penicilinei G s-a realizat din râul Ialomița, bazinul hidrografic Buzău-Ialomița, în zona aval de orașul Slobozia. În amonte de zona de prelevare a probelor sunt amplasate ferme de creștere a animalelor și teren agricol, precum și stația de epurare a orașului Slobozia. Recoltarea celor 4 probe s-a efectuat săptămânal, în perioada 15 martie -5 aprilie 2023. Proba de apă a fost prelevată de la aproximativ 0,5 m sub suprafața apei și depozitată într-o sticlă brună pentru analiză. După colectare, proba a fost depozitată în cutia cu gheață și livrată în ziua colectării probei la laborator, unde a fost depozitată la 4 °C în frigiderul de laborator până la analiză. Proba de apă de suprafață a fost filtrată prin filtre de polietersulfonă (PES) de 0,2 μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germania) înainte de injectarea directă în sistemul SPE-online-UHPLC-MS/MS.

5.2. Echipamente, reactivi

Echipamente

Identificarea și dozarea Penicilinei G, a fost efectuată utilizând cromatografie lichidă cuplată cu spectrometru de masă tandem, SPE-online-UHPLC-MS/MS Thermo Fisher Scientific™, Sistemul EQuan MAX Plus™UltiMate 3000 conectat la un spectrometru de masă triplu cvadrupol TSQ Quanttiva echipat cu o sursă de ionizare electro-spray în modul pozitiv și software-ul TraceFinder 3.2 (SUA) pentru achiziția și procesarea datelor. Tehnica utilizată este cea mai sensibilă și selectivă în comparație cu alte tehnici analitice frecvent utilizate, permițând detectarea și cuantificarea poluanților emergenti din categoria produselor farmaceutice la nivel de ng/l.

Reactivi

Standardul de referință utilizat pentru această analiză a fost Penicilina G (≥97% puritate) produsă de Dr. Ehrenstorfer, Germania. Apa ultrapură a fost furnizată de VWR Chemicals, utilizată la prepararea tuturor soluțiilor standard. Clasele HPLC acetonitril și acid formic pentru LC/MS au fost furnizate de Scharlau Chemie SA și VWR Chemicals.

5.3. Descrierea metodei SPE-online-UHPLC-MS/MS

Metoda dezvoltată în acest studiu pentru identificarea și dozarea Penicilinei G prin metoda SPE-online-UHPLC-MS/MS îndeplinește cerințele la nivelul Uniunii Europene (UE) cu privire la limita de

deteție. Identificarea și cuantificarea au fost efectuate în modul de monitorizare a reacției selectate (SRM), înregistrând tranzițiile dintre ionul precursor și cei doi ioni de produs cei mai abundenți pentru fiecare analit țintă, realizându-se astfel trei puncte de identificare per compus conform Deciziei Comisiei din 2002/657/CE privind efectuarea metodelor analitice și interpretarea rezultatelor.

Preconcentrarea online folosind comutarea coloanei a fost aplicată ca mijloc de a minimiza pretratarea probei și de a scurta timpul de analiză. Analiza cromatografică s-a efectuat cu ajutorul unui sistem Thermo Scientific™ EQUAN MAX™ de concentrare a probei online UHPLC-MS/MS echipat cu o coloană de preconcentrare Thermo Scientific™ Hypersil GOLD aQ™ (20 x 2,1 mm, dimensiunea particulei 12 μm) și o coloană analitică Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ (50 x 2,1 mm, dimensiunea particulei de 1,9 μm). Separarea cromatografică a analizelor a fost efectuată la un debit constant de 300 μL/min. Volumul de injectare a fost de 1 ml și temperatura coloanei a fost menținută la 20°C. Faza mobilă a constat din (A) apă ultrapură cu 0,1% (v/v) acid formic și (B) acetonitril cu 0,1% (v/v) acid formic; Programul de eluare cu gradient a funcționat după cum urmează: gradientul a început cu 2% faza mobilă B și 98% faza mobilă A până la timpul de 1,2 min; în intervalul 1,2-1,6 min, faza mobilă B a crescut de la 2% la 100% și a rămas la 100% în intervalul 1,6-9,0 min; în intervalul 9-11 min, faza mobilă B a scăzut de la 100% la 2%, iar faza mobilă A a crescut de la 0 la 98%. Toți compușii țintă au fost eluați din coloană în 14 minute. Fluxul din coloana LC a fost transferat într-un spectrometru de masă triplucvadrupol echipat cu o sursă ESI. Analizele spectrometrice de masă au fost efectuate într-un spectrometru de masă triplu cvadrupol echipat cu o sursă de ionizare electrospray (ESI) care a funcționat în modul de ionizare pozitivă.

Mod de ionizare: Electrospray încălzit (H-ESI) Tip de scanare: SRM Polaritate: pozitiv ion mod; Tensiune de pulverizare [V]: 3400 ion pozitiv; presiunea gazului de baleiaj [arb]: 0; Temperatura vaporizatorului [°C]: 300; Presiunea gazului în manta [arb]: 30; Presiune gaz auxiliar [arb]: 10; Temperatura capilară [°C]: 350; Presiunea gazului de coliziune [mTorr]: 1,5; Timp de ciclu [s]: 1; Lățimea vârfului: Q1/Q3 lățimea completă a unui vârf la jumătatea înălțimii sale maxime (FWHM) de 0,70 Da.

Modul de ionizare optimizat, tensiunile de fragmentare, energiile de coliziune și timpii de retenție cromatografică pentru fiecare analit sunt rezumate în tabelul 5.1.

Tabel 5.1. Tranziții selectate de monitorizare a reacției

Compound	Retention Time (min)	Polarity	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Collision Energy (V)
Penicillin G	5.94	Positive	335.2	176	14.1
				160	13
				114	31.5

5.4 Rezultate și discuții

Software-ul TraceFinder 3.2, prelucrează datele atât pentru realizarea curbelor de calibrare, validarea metodei, cât și prelucrarea datelor de achiziție pentru identificarea compușilor farmaceutici din diferite probe și respectă cerințele ghidurilor europene pentru validarea metodelor.

Metoda analitică utilizată în această lucrare a fost evaluată în termeni de liniaritate, repetabilitate, acuratețe și sensibilitate. Soluția standard de 100 μg/mL penicilină G achiziționată de la producător a fost utilizată pentru a prepara o soluție stoc de 1 μg/mL în 1:1 (v:v) apă - acetonitril. Din soluția stoc a fost preparată o soluție de 0,01 μg/ml (10 ng/ml), care a fost diluată în continuare la 5 niveluri corespunzătoare de 4 pg/ml, 20 pg/ml, 100 pg/ml, 500 pg/ml și 5000 pg/ml (4 ng/l, 20 ng/l, 100 ng/l, 500 ng/l și 5000 ng/l). Curba de calibrare standard a fost trasată pe baza rezultatelor obținute cu soluțiile standard de calibrare. S-a verificat liniaritatea răspunsului. Concentrația de penicilină G a fost calculată utilizând curba de calibrare standard. Curba de calibrare obținută pentru Penicilina G a fost liniară, cu un coeficient de corelație $R^2 > 0,999$ (Figura 5.1). Abaterrea standard relativă (RSD) a fost de 2,5% RSD pentru repetabilitate și 3,8% RSD pentru reproductibilitate. Limita de precizie <10% RSD a fost îndeplinită, indicând o precizie bună a metodei (Figura 5.1).

Validarea metodei a fost efectuată prin analiza a 10 replici la 5 concentrații diferite (4 ng, 20 ng, 100 ng, 500 ng și 5000 ng). Soluția de lucru standard mixtă cu concentrații de antibiotice cuprinse între 4 și 5000 ng/L a fost configurată pentru detectare și analiză. Limita de detecție și limita de cuantificare au fost calculate prin metoda bazată pe curba de calibrare (Miller și Miller, 1993). A fost calculată deviația standard reziduală a zonelor, ca abatere standard (σ). Limita de detecție a fost calculată cu formula $LOD = 3,3 \sigma/p$, unde p este panta curbei și limita de cuantificare $LOQ = 10 \sigma/p$ ($\sigma = 0,43$; $p = 46,5$). Limita de detecție (LOD) pentru Penicilina G testată în proba de apă a fost 0,03 ng/l iar limita de cuantificare (LOQ) 0,09 ng/l. Sistemul SPE on-line elimină erorile SPE umane și oferă o reproductibilitate foarte bună a metodei (Figura 5.2) [185].

Date din raportul de analiză: concentrație injectată: 32,452, timp de retenție: 5,92, aria: 1748, înălțimea: 2032.

Calibration Summary						
			A0	A1	A2	R^2
Compound	Manually Integrated	Curve Type	y-Intercept Mean RF	Slope		R^2 % RSD
penicillin G		L	2,39E+03	4,65E+01		0,999

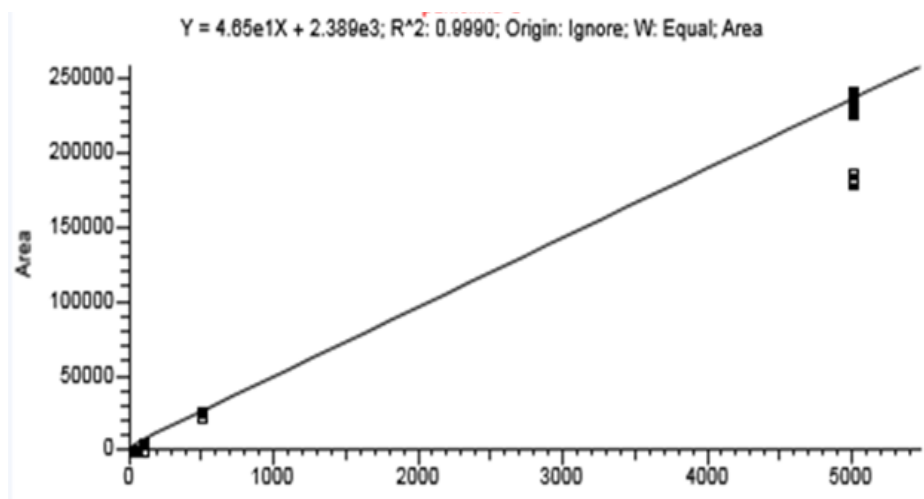
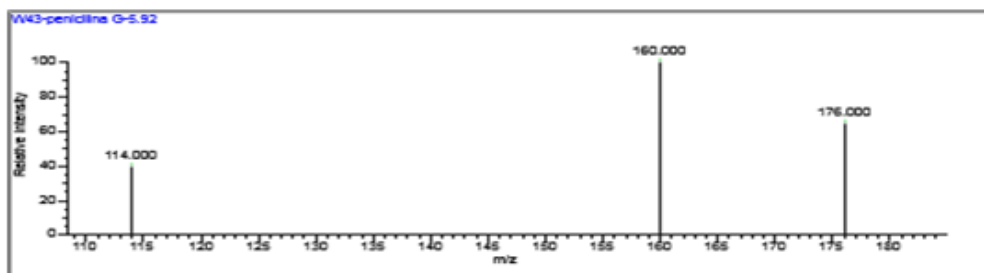


Figura 5.1. Curba de calibrare Penicilina G

MS-Data



MS - Reference

TracefinderData\32\Projects\antibiotice\testerepetabilitate\curba\calibrare\Data\proba_1.raw

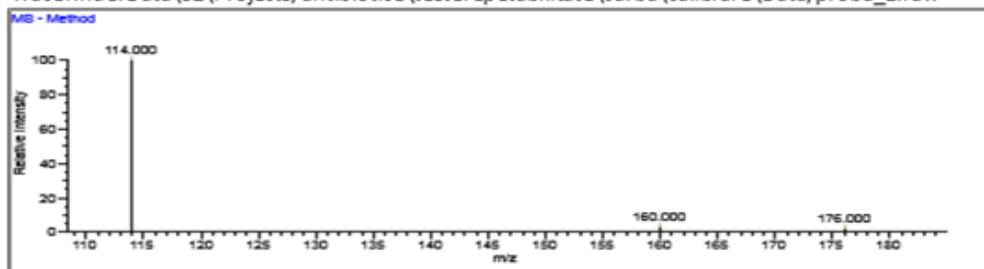


Figura 5.2. Teste repetabilitate - curba de calibrare

Rezultatele modului de ionizare optimizat, tensiunile de fragmentare, energiile de coliziune și timpul de retenție cromatografic pentru Penicilina G sunt date în Raportul de analiză Thermo Scientific Instrument (Figura 5.3).

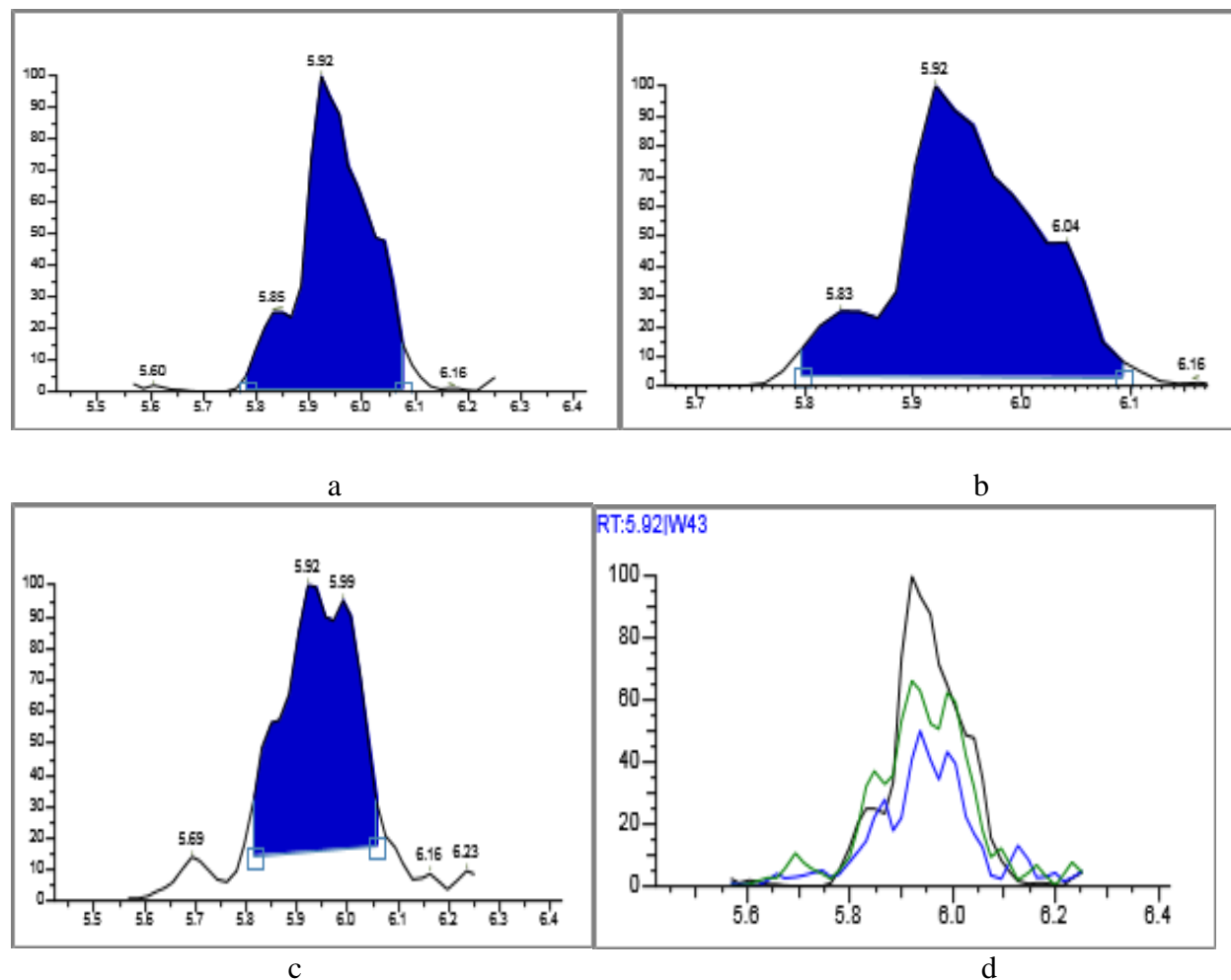


Figura 5.3. Raport de analiză Thermo Scientific Instrument
 Cromatograme ionice de confirmare pentru penicilina G:
 a. Quan Peak: 335.200-> 114.000 m/z, b. Qual Ion 1: 335.200->160.000 m/z,
 c. Qual Ion 2: 335.200-> 176.000 m/z, d. Cromatograme suprapuse ale celor 3 ioni de confirmare
 pentru penicilina G

Probele de apă de suprafață au fost prelevate la interval de o săptămână:

- proba 1 la data de 15.03.2023
- proba 2 la data de 22.03.2023
- proba 3 la data de 29.03.2023
- proba 4 la data de 05.04.2023

Rezultatele monitorizării Penicilinei G din probele de apă de suprafață analizate sunt prezentate în Figurile 5.4, 5.5, 5.6, 5.7.

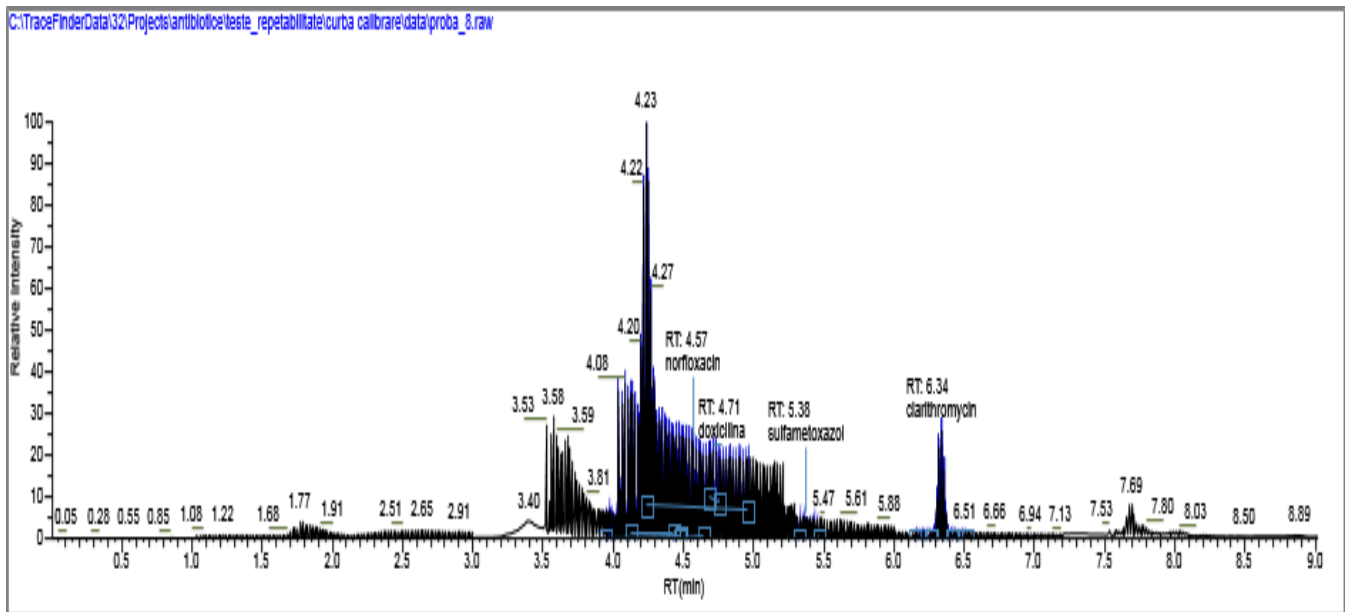


Figura 5.4. Identificarea, dozarea poluanților farmaceutici din râul Ialomița – proba 1

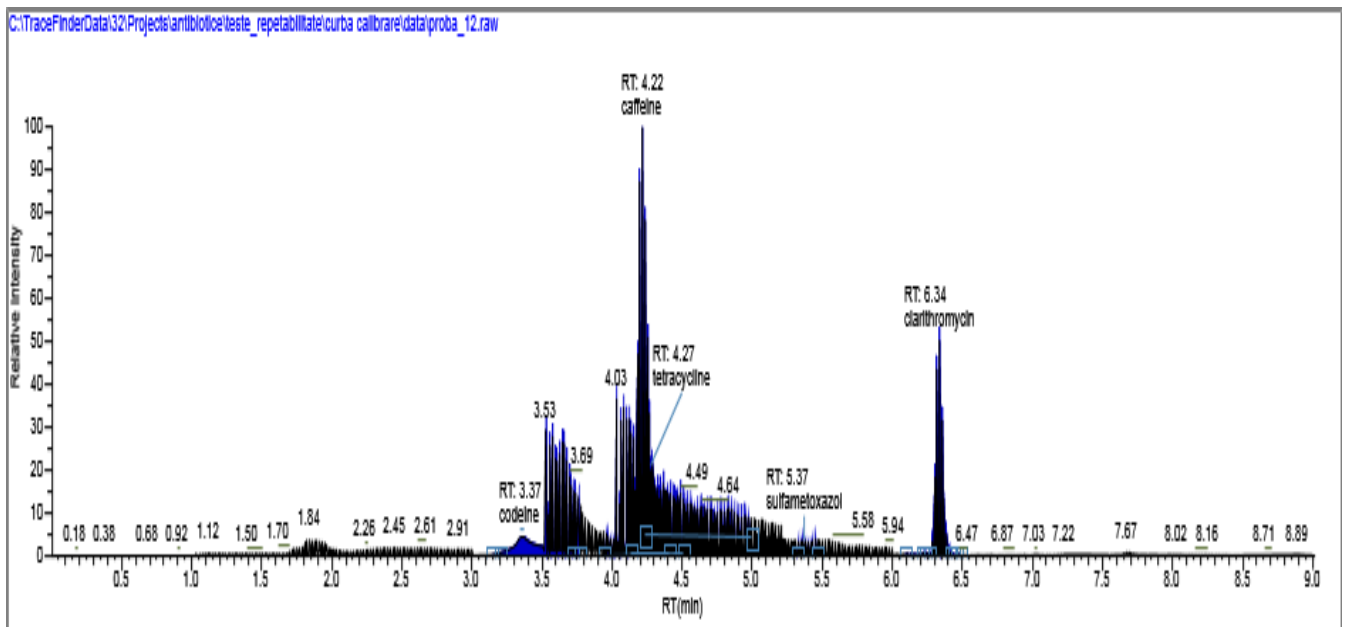


Figura 5.5. Identificarea, dozarea poluanților farmaceutici din râul Ialomița - proba 2

În probele de ape de suprafață analizate, 1 și 2 prelevate în data de 15 și 22 martie 2023 nu a fost detectată Penicilina G (Figura 5.4, Figura 5.5).

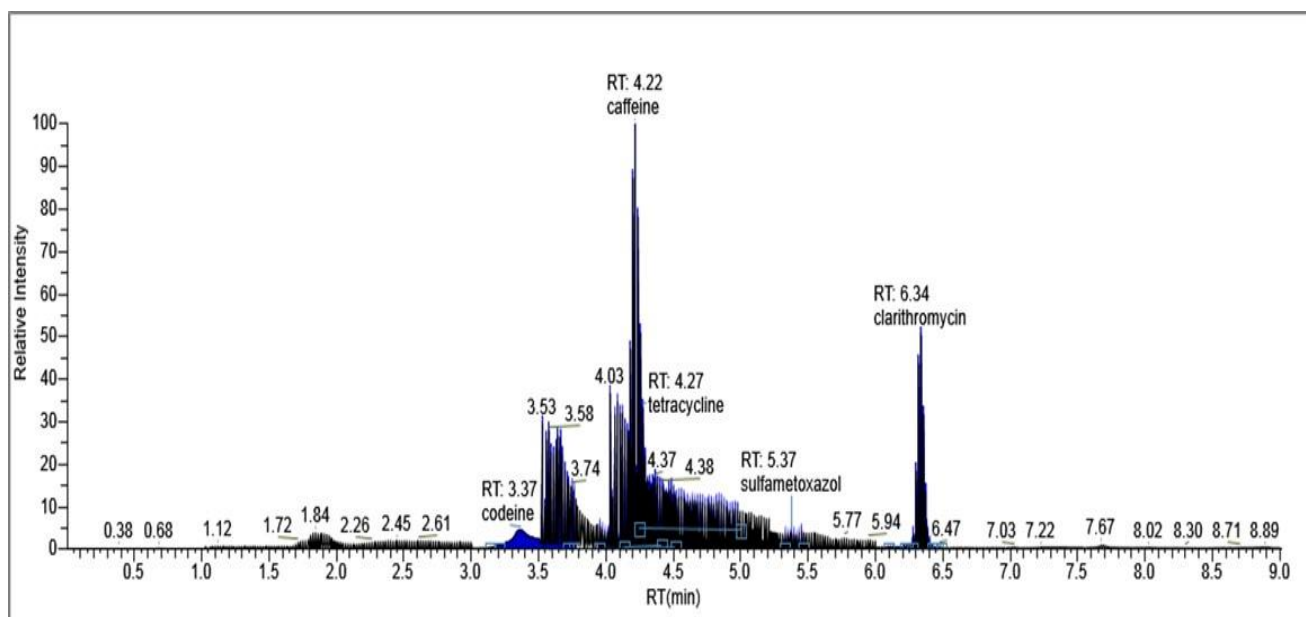


Figura 5.6. Identificarea, dozarea poluanților farmaceutici din râul Ialomița – proba 3

Penicilina G a fost identificată și dozată în concentrație de $0,032 \mu\text{g/l}$, doar în proba 3, prelevată în data de 29 martie 2023 (Figura 5.6).

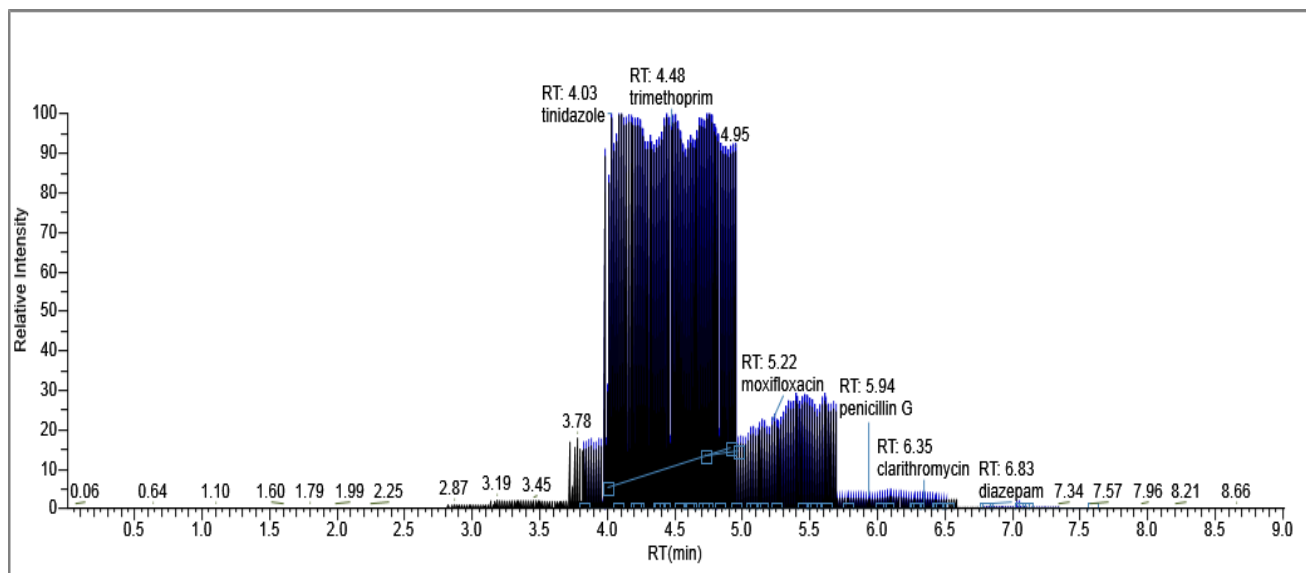


Figura 5.7. Identificarea, dozarea poluanților farmaceutici din râul Ialomița - proba 4

În figurile 5.4 - 5.7 sunt prezentate rezultatele corespunzătoare identificării, dozării fiecărui compus analizat, printre care și penicilina G, în funcție de timpul de retenție (RT), confirmarea conform MS, pentru ionul precursor și ionul produs (raportul de confirmare pentru proba analizată).

În proba 4 de ape de suprafață prelevată în data de 5 aprilie 2023 nu a fost detectată Penicilina G (Figura 5.7).

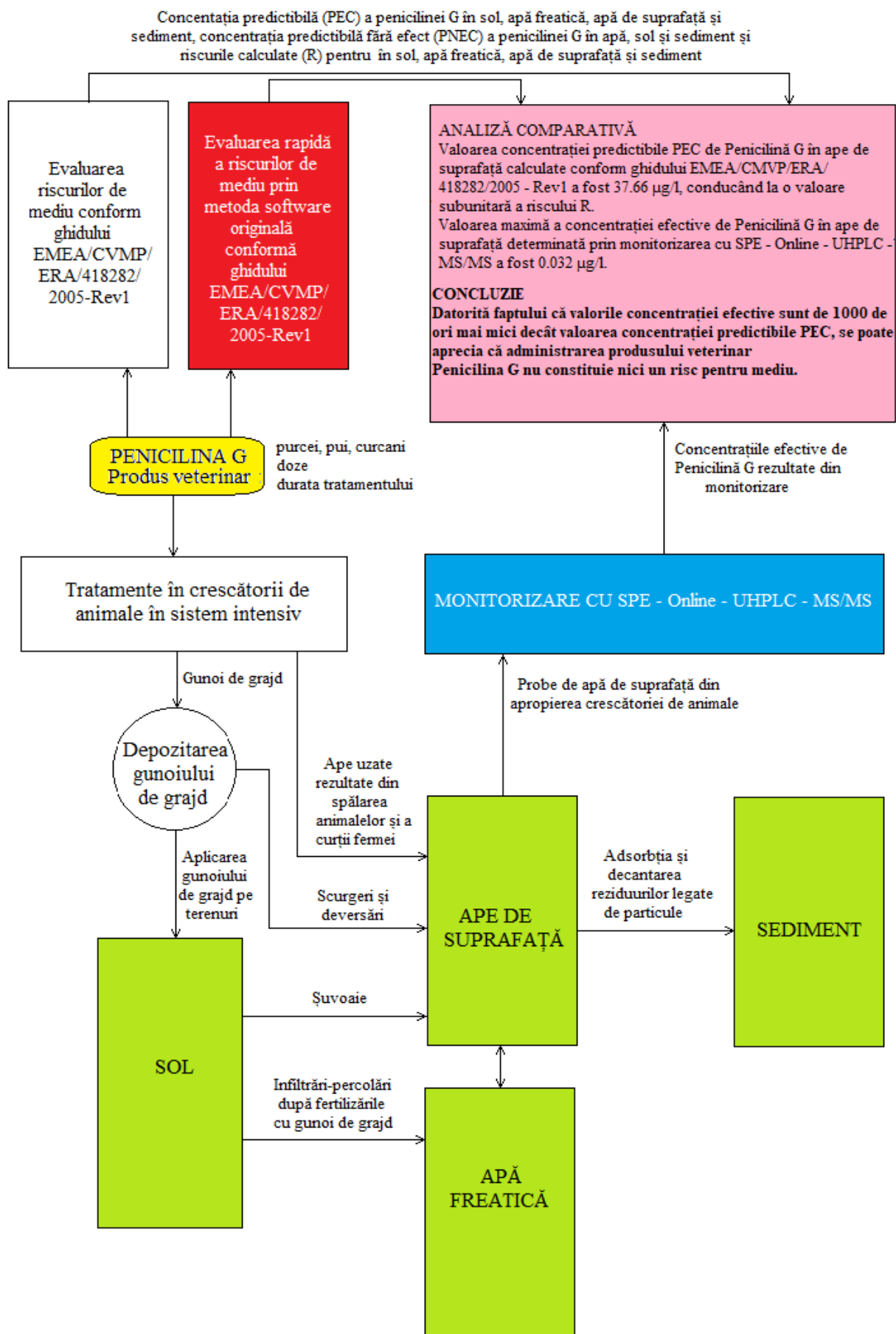


Figura 5.8. Schema evaluării de impact asupra mediului a penicilinei G, descrisă anterior

În figura 5.8 se prezintă schematic evaluarea impactului asupra mediului a penicilinei G dintr-un produs veterinar conform ghidului EMEA, prin metoda analitică și prin metoda software. Rezultatele obținute pentru compartimentul de mediu ape de suprafață prin metoda analitică / software, conform ghidului EMEA, se compară cu rezultatele obținute prin metoda de analiză SPE on line UHPLC-MS/MS.

Astfel de studii sunt foarte importante pentru a detecta reziduurile de Penicilina G și potențialele efecte indirecte ale expunerii mediului asupra sănătății ecologice și umane.

În probele de apă de suprafață investigate nu a fost detectată Penicilina G.

Doar într-o probă au fost detectate urme de Penicilina G.

Prin acest studiu, SPE-online-UHPLC-MS/MS s-a dovedit a fi un instrument analitic puternic care permite detectarea foarte sensibilă a antibioticelor în apele de suprafață, chiar și atunci când acestea sunt prezente sub formă de urme (ng/l). Acest tip de analiză va oferi perspective importante asupra apariției și distribuției antibioticelor (și a altor produse farmaceutice) în rezervele de apă potabilă și ar putea ajuta la impunerea unor limite adecvate asupra cantităților de aceste substanțe chimice care au voie să pătrundă în mediu.

În evaluarea riscului pentru mediu a penicilinei G în conformitate cu ghidul EMEA, concentrația predictibilă de penicilina G în apele de suprafață (**37,66 $\mu\text{g/l}$**) este mai mare decât cea determinată experimental (**0.032 $\mu\text{g/l}$**), dar riscul de mediu calculat (R) este subunitar și indică faptul ca tratamentul efectuat cu medicamentul veterinar considerat nu prezintă nici un risc asupra mediului.

Metoda dezvoltată pentru cuantificarea Penicilinei G s-a utilizat și pentru detecția altor poluanți farmaceutici.

În proba 1, au fost detectate următoarele substanțe active: norfloxacin 39 ng/l, sulfametoxazol 35 ng/l, claritromicin 53 ng/l și doxiciclin 62 ng/l (Figura 5.4).

În proba 2 au fost detectate următoarele substanțe active: cafeină 20 ng/l, sulfametoxazol 47 ng/l, tetraciclin 94 ng/l și claritromicin 85 ng/l (Figura 5.5).

În proba 3 au fost detectate următoarele substanțe active: cafeină 41 ng/l, sulfametoxazol 62 ng/l, tetraciclin 45 ng/l și claritromicin 58 ng/l (Figura 5.6).

În proba 4 au fost detectate următoarele substanțe active: trimetoprim 93 ng/l, tinidazol 41 ng/l, moxifloxacină 56 ng/l și claritromicin 65 ng/l (Figura 5.7).

Monitorizarea acestor substanțe active s-a efectuat timp de 3 luni. S-au prelevat probe lunar și s-au detectat concentrații mici, la nivel de ng/l.

CAPITOLUL 6

MONITORIZAREA TRIMETOPRIMULUI DIN APELE DE SUPRAFAȚĂ PRIN SPE- ONLINE-UHPLC-MS/MS

Medicamentul veterinar cu trimetoprim a fost administrat la cai, sub formă injectabilă, în doză de 30 mg/kg greutate corporală de 2 ori pe zi.

Formula structurală: 5-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methyl]pyrimidine-2,4-diamine (Figura 6.1)

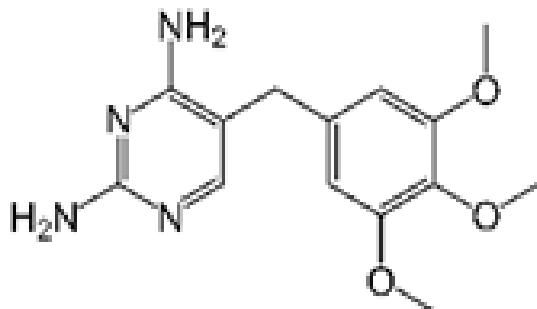


Figura 6.1. Structura trimetoprimului (PubChem) [184]

6.1. Prelevarea și pregătirea probelor de apă

Identificarea și dozarea trimetoprimului s-a realizat din râul Ialomița, bazinul hidrografic Buzău-Ialomița, în zona aval de orașul Slobozia. În amonte de zona de prelevare a probelor sunt amplasate ferme de creștere a animalelor și teren agricol, precum și stația de epurare a orașului Slobozia. Recoltarea celor 4 probe s-a efectuat săptămânal, în perioada 5 aprilie-25 aprilie 2023. Proba de apă a fost prelevată de la aproximativ 0,5 m sub suprafața apei și depozitată într-o sticlă brună pentru analiză. După colectare, proba a fost depozitată în cutia cu gheață și livrată în ziua colectării probei la laborator, unde a fost depozitată la 4 °C în frigiderul de laborator până la analiză. Proba de apă de suprafață a fost filtrată prin filtre de polietersulfonă (PES) de 0,2 μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germania) înainte de injectarea directă în sistemul SPE-online-UHPLC-MS/MS.

6.2. Echipamente, reagenți

Echipamente

Identificarea și dozarea trimetoprimului a fost efectuată utilizând cromatografie lichidă cuplată cu spectrometru de masă tandem, SPE-online-UHPLC-MS/MS Thermo Fisher Scientific™, Sistemul EQUAN MAX Plus™UltiMate 3000 conectat la un spectrometru de masă triplu cvadripol TSQ Quanttiva echipat cu o sursă de ionizare electro-spray în modul pozitiv și software-ul TraceFinder 3.2 (SUA) pentru achiziția și procesarea datelor. Tehnica utilizată este cea mai sensibilă și selectivă în comparație cu alte tehnici analitice frecvent utilizate, permițând detectarea și cuantificarea poluanților emergenti din categoria produselor farmaceutice la nivel de ng/l.

Reagenți

Standardul de referință utilizat pentru această analiză a fost trimetoprim (≥97% puritate) produsă de Dr. Ehrenstorfer, Germania. Apa ultrapură a fost furnizată de VWR Chemicals, utilizată la prepararea tuturor soluțiilor standard. Clasele HPLC acetonitril și acid formic pentru LC/MS au fost furnizate de Scharlau Chemie SA și VWR Chemicals.

6.3. Descrierea metodei SPE-online-UHPLC-MS/MS

Modul de ionizare optimizat, tensiunile de fragmentare, energiile de coliziune și timpii de retenție cromatografică pentru fiecare analit sunt rezumate în tabelul 6.1.

Compound	Retention Time (min)	Polarity	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Collision Energy (V)
				261,1	25,1
Trimetoprim	4.48	Positive	291,2	230	23,5
				123,1	26,4

Tabel 6.1. Tranziții selectate de monitorizare a reacției

Rezultatele modului de ionizare optimizat, tensiunile de fragmentare, energiile de coliziune și timpul de reținere cromatografic pentru trimetoprim sunt date în Raportul de analiză Thermo Scientific Instrument (Figura 6.2).

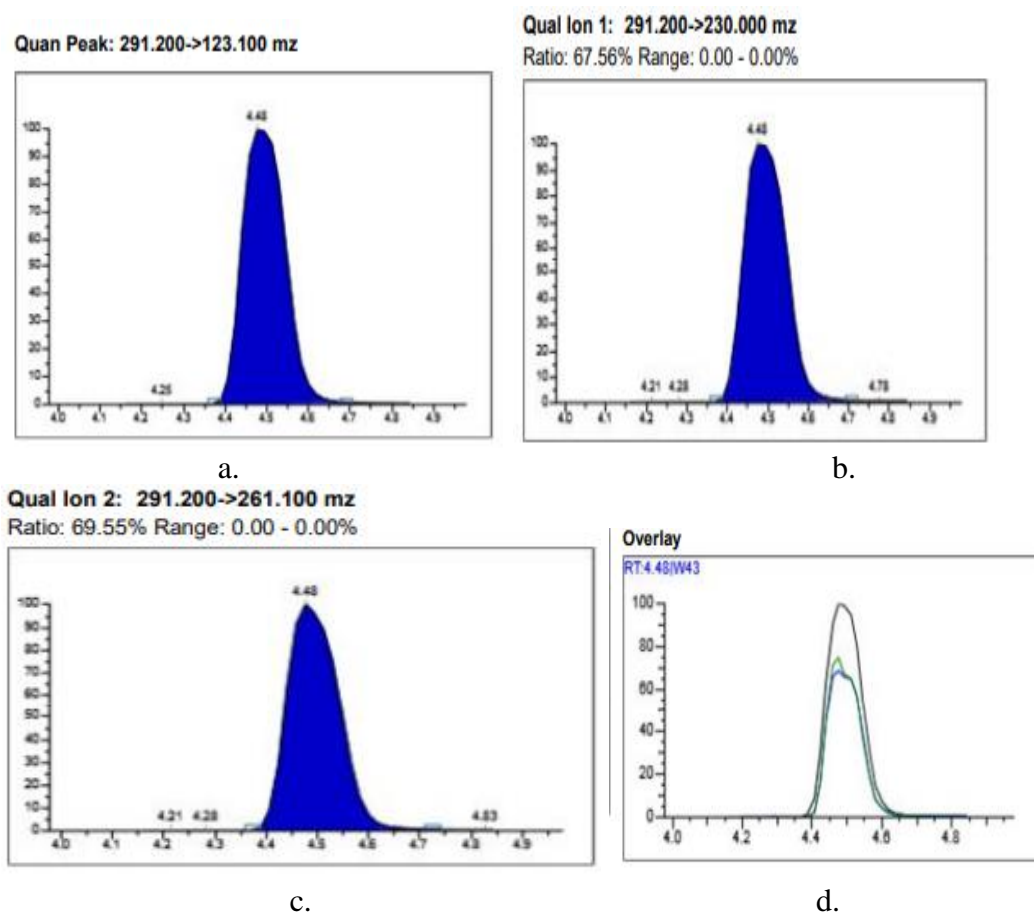


Figura 6.2. Raport de analiză Thermo Scientific Instrument
Cromatograme ionice de confirmare pentru trimetoprim:

a. Quan Peak: 291.200-> 123.100 m/z, b. Qual Ion 1: 291.200->230.000 m/z,
c. Qual Ion 2: 291.200-> 261.000 m/z, d. cromatograme suprapuse ale celor 3 ioni de confirmare pentru trimetoprim

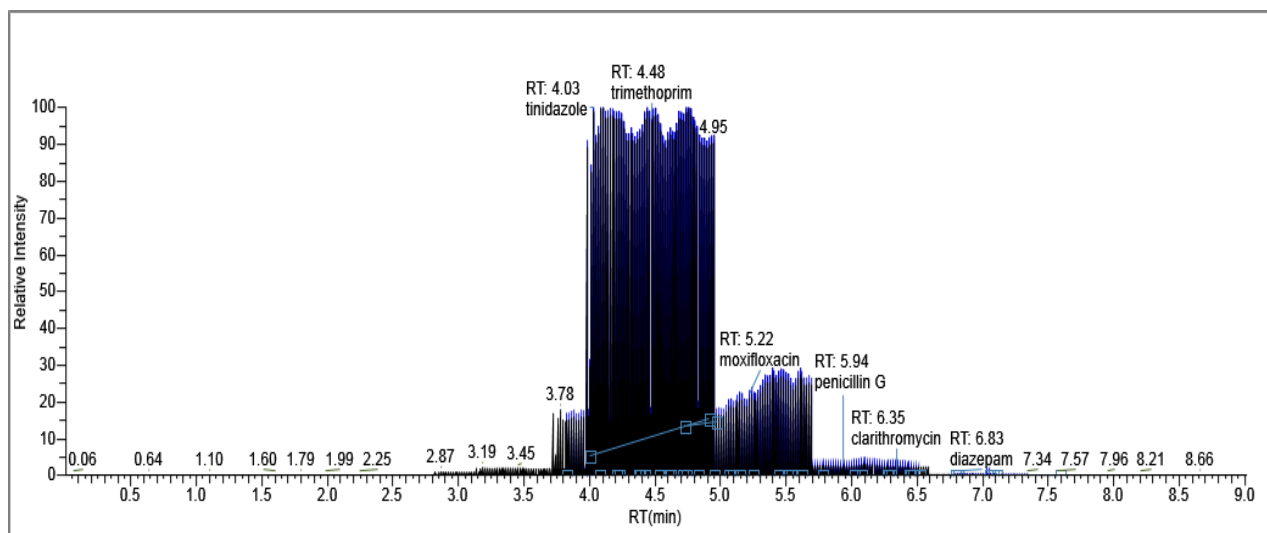


Figura 6.3. Identificarea, dozarea poluanților farmaceutici din râul Ialomița – proba 1

Trimetoprimul a fost detectat într-o singură probă de apă de suprafață, proba 1 (prelevată la data de 5 aprilie, în concentrație de **93 ng/l**).

În figura 6.3 sunt prezentate rezultatele corespunzătoare identificării, dozării fiecărui compus analizat, printre care și trimetoprimul, în funcție de timpul de retenție (RT), confirmarea conform MS, pentru ionul precursor și ionul produs (raportul de confirmare pentru proba analizată).

Pe baza studiilor [162-174], se consideră că 1 $\mu\text{g/l}$ ar fi o limită de expunere de protecție rezonabilă pentru trimetoprim în mediile acvatice.

Antibioticele β -lactamice (penicilina, primul antibiotic β -lactamic descoperit) nu sunt de obicei detectate în mediile acvatice analizate în Europa datorită labilității lor ridicate la căldură, lumină, pH extrem, ioni metalici, agenți oxidanți și reducători, nucleofili și solvenți, cum ar fi apa, care duc la hidroliza lor în condiții de temperatură ambientală și pH. Cu toate acestea, pe baza mai multor studii efectuate în UE, s-au determinat intervalele de concentrații de β -lactame în apă și anume: 18–6196 ng/l în afluentul stațiilor de tratare a apei uzate, 47–1205 ng/l, în eluent al stațiilor de epurare și 3,57–552 ng/l, în apele de suprafață [175].

CAPITOLUL 7

CONCLUZII GENERALE, CONTRIBUȚII ORIGINALE ȘI PERSPECTIVE

7.1 Concluzii generale

1. În Uniunea Europeană medicamentele de uz veterinar sunt autorizate pe baza unei proceduri de evaluare a riscurilor de mediu, procedură aplicată centralizată (la nivel european) sau printr-o procedura descentralizată și de recunoaștere reciprocă (la nivel de stat membru) și indiferent de nivel, cadrul de evaluare a riscurilor este același pentru orice procedură urmată.

2. Evaluarea riscului asupra mediului conține analiza potențialelor efecte adverse rezultate prin expunerea mediului la un medicament veterinar și este efectuată în conformitate cu ghidurile EMEA (VICH GL6) și VICH GL38).

3. Cerințele de evaluare a riscului pentru mediu în funcție de tipul de procedură sunt incluse în ghidul EMEA/CVMP/182112/2006, elaborat de VICH și aprobat în 2009, pentru a armoniza cerințele de date și procesul de evaluare a riscurilor de bază pentru aprobarea, autorizarea produselor medicamentoase veterinare în țările participante.

4. Regulamentul (UE) 2019/6 din ianuarie 2022, urmărește actualizarea cadrului de reglementare pentru produsele medicinale veterinare și înlocuiește Directiva 2001/82/CE, însă cunoașterea riscurilor de mediu ale tuturor medicamentelor veterinare autorizate și coerența evaluărilor rămâne destul de similară între ambele legislații.

5. Procesul de evaluare a riscurilor de mediu ale medicamentelor veterinare este progresiv, în două faze, și se poate finaliza după faza I, de nivel inferior, pentru produsele medicamentoase veterinare care nu prezintă risc pentru mediu, sau după parcurgerea fazei II, de nivel superior, pentru produsele medicamentoase veterinare cu risc pentru mediu; în funcție de gradul de risc pentru mediu în faza II se pot parcurge treptele A, B și C prin utilizarea unor proceduri de rafinare a parametrilor de risc determinați în faza I pe baza unor date specifice pentru profilul de siguranță al substanțelor analizate sau a unor analize riscuri-beneficii.

6. Problematika evaluării riscurilor de mediu ale medicamentelor veterinare este de mare importanță pe plan mondial fiind intens dezbătută într-o multitudine de lucrări de specialitate care acoperă o arie largă, principale preocupări actuale referindu-se în principal la problemele legate de implementarea în practică a noii legislații din domeniul produselor medicinale veterinare din perspectiva procesului de evaluare a riscurilor de mediu, la analize ale datelor de risc de mediu ale produselor medicamentoase veterinare autorizate la nivel centralizat, la analize critice ale datelor conținute în ghidurile de evaluare actuale cu propuneri de actualizare a acestora în funcție de tendințele actuale de evoluție a sistemelor de creștere a animalelor, la date legate de parametrii riscurilor în sol, apă, sediment, pentru diferite medicamente veterinare (în special antibiotice, dar și alte clase), la studii de toxicitate legate de diferite specii de viețuitoare specifice diferitelor compartimente de mediu, la tehnici neconvenționale de evaluare a riscurilor de mediu ale produselor medicamentoase veterinare.

7. Au fost efectuate evaluări de impact asupra mediului prin metoda analitică pentru următoarele medicamente veterinare: LIN – SPE – MIX 880 - pulbere hidrosolubilă pentru suine și găini, Levasol 10% - soluție orală pentru bovine, ovine, caprine, suine și păsări, Florfenicol FP 10% - soluție orală pentru găini, broileri, și suine, Tiasol 10% - soluție orală, indicată la suine, iepuri și păsări (găini, broileri, curcani).

Au fost efectuate evaluări de impact asupra mediului prin cele două metode, analitică și software pentru următoarele medicamente veterinare: Amprolium FP 25% - premix pentru găini, broileri, curcani și Benzilpenicilina potasica 25% - pulbere orală pentru porci, broileri și curcani.

8. În urma evaluării acestor produse, s-a constatat că nivelurile de reziduuri de substanțe active în sol, apă, sediment, au fost în limite corespunzătoare și nu au fost depistate efecte nedorite asupra mediului înconjurător.

9. Studiul de evaluare a riscului de mediu pentru *levamisol* a fost finalizat în faza I, necesitând doar calcule de determinare a PEC-urilor, PNEC-urilor și riscurilor, care au avut valori subunitare, trăgându-se concluzia că produsul nu prezintă riscuri pentru mediu.

10. Studiul de evaluare a riscului de mediu pentru *tiamulin* a fost finalizat în faza IIA, necesitând pe lângă calculele de fază I, și calcule de rafinare a PEC-urilor, pe baza degradării în dejecții și în sol, în urma

căroră valorile riscurilor au devenit subunitare, trăgându-se concluzia că impactul asupra mediului al produsul este acceptabil.

11. Studiul de evaluare a riscului de mediu pentru *florfenicol* a fost finalizat în faza IIB, necesitând pe lângă calculele de fază I, și calcule de rafinare a PEC-urilor, pe baza degradării în dejecții și în sol, și calcule de rafinare a PNEC-urilor, pe baza unor studii toxicologice aprofundate, în urma căroră valorile riscurilor au devenit subunitare, trăgându-se concluzia că este acceptabil din punct de vedere al impactul asupra mediului, mai ales ținându-se cont de eficacitatea acestuia ca produs împotriva unui spectru larg de microorganisme patogene.

12. Studiul de evaluare a riscului de mediu pentru produsul cu două ingrediente active, *lincomicină și spectinomycină*, a fost finalizat la nivelul inferior, faza I, cu concluzia că produsul nu prezintă riscuri pentru mediu.

13. Pe baza prescripțiilor din ghidurile EMEA, a fost elaborat un algoritm original de evaluare a riscurilor de mediu pe produse medicamentoase veterinare corespunzător fazei I și fazei IIA.

14. Algoritmul este compus din mai multe secțiuni succesive de determinare a : PEC-urilor inițiale, a PNEC-urilor, a riscurilor inițiale (corespunzătoare Fazei I), a PEC-urilor rafinate, a riscurilor rafinate pentru sol, apă freatică, apă de suprafață și sediment (corespunzătoare Fazei II treapta A).

15. Pe baza algoritmului de evaluare a fost elaborat în mediul MATHCAD un software ware original interactiv care:

- este foarte ușor și comod de operat permițând introducerea cu ușurință a tuturor datelor privitoare la produsul medicinal veterinar analizat și la animalele în tratament;

- urmează și explicitează concret pașii algoritmului de calcul având înglobate toate datele din ghid specifice acestora, nemaifiind necesară consultarea acestuia în timpul analizei;

- efectuează calculele matriciale pentru a lua în considerare parametrii de evaluare a riscului de mediu concomitent pentru toate speciile și categoriile de animale în tratament;

- conține mai multe variante de calcul a unor parametri permițând alegerea variantei celei mai corespunzătoare;

- permite efectuarea unor analize de evaluare a riscului de mediu deosebit de minuțioase în perioade extrem de reduse de timp.

16. În software sunt cuprinse toate datele și relațiile specifice din ghiduri, acestea nemaifiind necesare în timpul utilizării.

17. Utilizând software-ul, a fost elaborată o metodă rapidă de evaluare a riscului de mediu a produselor medicamentoase, originală care se constituie într-un instrument deosebit de util și eficace pentru specialiștii din domeniu.

18. În lucrare sunt prezentate două aplicații ale metodei rapide de evaluare a riscului de mediu a produselor medicamentoase, pentru produsele AMPROLIUM și PENICILINA G, care conțin listing-urile software-ului aplicat în cazul celor două produse medicamentoase veterinare, pe lângă specificațiile de specialitate.

19. În această teză de doctorat, a fost dezvoltată o metodologie bazată pe extracția în fază solidă online (SPE) cromatografie lichidă de ultra-înaltă performanță cuplată la un spectrometru de masă cu triplu cvadrupol (UHPLC-MS/MS) pentru determinarea simultană a mai multor compuși, prezenți în medicamentele veterinare, dintre care am selectat penicilina G și trimetoprim. Metoda propusă oferă avantaje față de metodele deja disponibile, cum ar fi versatilitatea (mai mulți compuși pot fi analizați simultan), timp mai scurt necesar pentru analiză, robustețe și sensibilitate. Metoda a fost validată cu succes în apele de suprafață și în apele uzate influente și efluente, cu limite de detectare la nivel de nanograme pe litru.

7.2 Contribuții originale

1. Studiul documentar privitor la stadiul actual în domeniul evaluării riscului de mediu al produselor medicamentoase veterinare.

2. Studiul de evaluare a riscului de mediu a produsului *levamisol*.

3. Studiul de evaluare a riscului de mediu a produsului *tiamulin*.

4. Studiul de evaluare a riscului de mediu a produsului *florfenicol*.
5. Studiul de evaluare a riscului de mediu a produsului combinat *lincomicină și spectinomycină*.
6. Algoritm general de evaluare a riscurilor de mediu pentru produse medicamentoase veterinare.
7. Algoritm de determinare a PEC-urilor.
8. Algoritm de determinare a PNEC-urilor.
9. Algoritm de determinare a riscurilor (conform fazei I).
10. Algoritm de determinare a PEC-urilor rafinate.
11. Algoritm de determinare a riscurilor rafinate (conform fazei IIA).
12. Software-ul interactiv de evaluare a riscurilor de mediu pentru produse medicamentoase veterinare.
13. Aplicația software-ului la AMPROLIUM.
14. Aplicația software-ului la PENICILINA G.
15. Studiu de evaluare rapidă a riscului de mediu pentru AMPROLIUM.
16. Studiu de evaluare rapidă a riscului de mediu pentru PENICILINA G.
17. Studiul de monitorizare a PENICILINEI G din apele de suprafață prin metoda SPE-online-UHPLC-MS/MS.
18. Studiul de monitorizare a trimetoprimului din apele de suprafață prin metoda SPE-online-UHPLC-MS/MS.
19. Evaluarea rapidă a impactului asupra mediului a penicilinei G într-un produs veterinar utilizând o metodă software originală și monitorizare de către SPE-Online-UHPLC-MS/MS.
20. Analiza transferului tiamulinei în țesutul animal după administrarea orală: un factor important pentru asigurarea siguranței alimentelor și a protecției mediului (HPLC-MS/MS).
21. Cercetări privind determinarea reziduurilor de levamisol din țesutul de bovine, ovine, caprine, porcine și de pasăre (HPLC-MS/MS).

7.3 Perspective ale cercetărilor viitoare

1. Continuarea cercetărilor privitoare la evaluarea riscurilor de mediu ale produselor medicamentoase veterinare, în special pentru faza II Treapta B și faza II Treapta C.
2. Conceperea unor metode rapide de evaluare a riscurilor de mediu aplicabile în faza II Treapta B
3. Dezvoltarea unor cercetări experimentale de determinare a conținutului de substanțe active din medicamentele veterinare în probe de apă de suprafață și apă reziduală.
4. Dezvoltarea unor baze de date care să conțină referințe despre proprietățile fizico-chimice ale ingredientelor active ale produselor medicamentoase veterinare, respectiv despre caracteristicile toxicologice ale acestora în compartimentele de mediu, care să permită un acces rapid la datele necesare rulării software-ului.
5. Metodele de evaluare a impactului asupra mediului prezentate în această lucrare pot sta la baza unor viitoare evaluări pentru alte clase de substanțe active din produse farmaceutice veterinare.
6. Dezvoltarea unor modele de simulare FOCUS, pentru a fi utilizate în calcularea concentrațiilor predictibile ale produselor veterinare în apele subterane și de suprafață.
7. Dezvoltarea unor cercetări experimentale privind influența substanțelor active din medicamentele veterinare asupra algelor.

BIBLIOGRAFIE

1. Joanne C. Chee-Sanford, Ivan J. Krapac, Anthony C. Yannarell and Roderick I. Mackie - Environmental Impacts of Antibiotic Use in the Animal Production Industry, Prevention of Infectious Diseases in Livestock and Wildlife, 2012, p. 228-239, ISBN: ISBN 978-91-86189-12-9.
2. Hamscher, G.; Sczesny, S.; Höper, H.; Nau, H., Determination of Persistent Tetracycline Residues in Soil Fertilized with Liquid Manure by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 2002, 74, 1509–1518.
3. Kolpin, D. W.; et al. Response to Comment on “Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance”, *Environ. Sci. Technol.* 2002, 36, 1202–1211.
4. Wall, R.; Strong, L., Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin, *Nature* 1987, 327, 418–421.
5. Halling-Sørensen, B.; Nielsen, S. N.; Jensen, J. Environmental Assessment of Veterinary Medicines in Denmark. Danish Environmental Protection Agency: Copenhagen, Denmark, 2002, www.mst.dk/udgiv/Publications/2002/87-7944-971-9/pdf/87-7944-972-7.PDF
6. Eric Silberhorn, Ph.D. Environmental Safety Team Division of Scientific Support, Office of New Animal Drug Evaluation, Environmental Impact (Risk) Assessment of Veterinary Pharmaceuticals, fda.gov
7. IstvánSebestyéna, KatalinMonostoryb, GáborHirkaa, Environmental risk assessment of human and veterinary medicinal products - Challenges and ways of improvement, *Microchemical Journal*, Volume 136, January 2018, Pages 67-70.
8. Na Wang,Xinyan Guo,Jing Xu,Xiangji Kong,Shixiang Gao &Zhengjun Shan, Pollution characteristics and environmental risk assessment of typical veterinary antibiotics in livestock farms in Southeastern China, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, Volume 49, 2014 - Issue 7.
9. Andreu Rico Marco Vighi Paul J. Van den Brink Mechteld ter Horst Ailbhe Macken Adam Lillicrap Lynne Falconer Trevor C. Telfer, Use of models for the environmental risk assessment of veterinary medicines in European aquaculture: current situation and future perspectives, First published: 12 July 2018 <https://doi.org/10.1111/raq.12274>
10. Committee for Veterinary Medicinal Products. Note for Guidance: Environmental Risk Assessment for Veterinary Medicinal Products Other Than GMO-Containing and Immunological Products; EMEA/CVMO/055/96-Final; European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: London, 1997. www.emea.eu.int/pdfs/vet/regaffair/005596en.pdf.
11. Eirkson, C.; Harrass, M. C.; Osborne, C. M.; Sayre, P. G.; Zeeman, M. G. Environmental Assessment Technical Handbook; NTIS PB-87-175345/AS; U.S. Food and Drug Administration: Washington, DC, 1987.
12. Jongbloed, R. H.; Kan, C. A.; Blankendaal, V. G.; Bernhard, R. Milieurisico's van diergenasmiddelen en veevoeradditieven in Nederlands oppervlaktewateren; Rep. 31635; TNO-MEP, Apeldoorn, The Netherlands, 2002.
13. U.S. Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine.
14. Rafael Grossi Botelho, Sérgio Henrique Monteiro and Valdemar Luiz Tornisielo -Veterinary Antibiotics in the Environment, Submitted: October 2nd, 2014 Reviewed: May 19th, 2015 Published: September 2nd, 2015, DOI: 10.5772/60847.
15. Yujie Ben, Caixia Fu, Min Hu, Lei Liu, Ming Hung Wong, Chunmiao Zheng, Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review, *Environmental Research* 169 (2019) 483-493.

16. Smith, K. E., et al., Quinolone-Resistant *Campylobacter jejuni* Infections in Minnesota, 1992–1998, *Engl. J. Med.* 1999, 340, 1525–1532.
17. Rhodes G., Huys G., Swings J., McGann P., Hiney M., Smith P., Pickup R.W., Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant tet A, *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 3883–3890.
18. Sandra Maria Lopes de Souza, Eliane Carvalho de Vasconcelos, Maurício Dziedzic, Cíntia Mara Ribas de Oliveira, Environmental risk assessment of antibiotics: An intensive care unit analysis, *Chemosphere* 77 (2009) 962–967
19. Richard H. Lindberga., Karin Bjo`rklundb, Per Rendahlc, Magnus I. Johanssond, Mats Tysklinda , Barbro A.V. Anderssona, Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants, *WATER RESEARCH* 41 (2007) 613-619.
20. Ghidul EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev1.
21. EUR- Lex.
22. Jurnalul Oficial al Uniunii Europene, Regulamentul (UE) 2019/6 al parlamentului european și al consiliului privind produsele medicinale veterinare și de abrogare a Directivei 2001/82/CE
23. Technical Guidance Document on Risk Assessment, Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market.
24. European Medicines Agency, Veterinary medicines: regulatory information,
25. How to Calculate Predicted No-Effect Concentration (PNEC), ChemSafetyPRO, Topics > CRA > Environmental Risk Assessment, Update:2018-02-09.
26. ECHA – Guidance on information requirements and chemical safety assessment - Chapter R10. Characterisation of dose [concentration] – response for environment.
27. ECHA – Guidance on information requirements and chemical safety assessment - Chapter R16. Environmental Exposure Estimation.
28. ECHA Chapter 14: Hazardous to the aquatic environment
29. Boxall A.B.A., Tiede K., Bryning G., Bevan R., Tam C., Levy L.S., Desk-based study of current knowledge on veterinary medicines in drinking water and estimation of potential levels, December 2011.
30. Boxall A.B.A., Fogg L., Blackwell P.A., Kay P., Pemberton E.J., Review of Veterinary Medicines in the Environment, R&D Technical Report P6-012/8/TR, Research Contractor: Cranfield Centre for EcoChemistry
31. Bent Halling Sørensen, Søren Nors Nielsen, John Jensen, Environmental Assessment of Veterinary Medicinal Products in Denmark, Environmental Project No. 659 2002, Danish Ministry of the Environment.
32. Jean-Pierre Lumaret, Jörg Römbke, Nassera Kadiri, Antiparasitics and their impact on soil and dung fauna, International UBA Workshop “Pharmaceuticals in Soil, Sludge and Slurry” Dessau 18-19 June 2013.
33. Klaus Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I *Chemosphere* 75, 2009, 417–434.
34. Mark Crane, Alistair B. A. Boxall, Katie Barrett, *Veterinary Medicines in the Environment* CRC Press, 19 apr. 2016.
35. European Commission, Joint research centre (JRC), European soil data centre (ESDAC), Projects, FOCUS DG SANTE.

36. Julia Fabrega, Ricardo Carapeto, Regulatory review of the environmental risk assessment of veterinary medicinal products in the European Union, with particular focus on the centralised authorisation procedure, Published: 20 July 2020
37. Rezoluția Parlamentului European din 17 septembrie 2020 referitoare la o abordare strategică privind impactul substanțelor farmaceutice asupra mediului (2019/2816(RSP))
38. Environment, religion and culture in the context of the 2030 agenda for sustainable development, UN environment programme
39. Guillen J, Asche F, Carvalho N, Fernández Polanco JM, Llorente I, Nielsen R, Nielsen M, Villasante S (2019) Aquaculture subsidies in the European Union: evolution, impact and future potential for growth. *Mar Policy* 104:19–28
40. OECD, Pharmaceutical residues in freshwater: hazards and policy responses. OECD studies on water. OECD Publishing, Paris (FR), 2019 (10.1787/c936f42d-en).
41. CMDv (2020) Authorised fish products: situation in Europe (EMA/CMDv/650880/2018 rev 2)
42. EFSA Scientific Committee, More SJ, Bampidis V, Benford D, Bennekou SH, Bragard C, Halldorsson TI, Hernández-Jerez AF, Koutsoumanis K, Naegeli H, Schlatter JR, Silano V, Nielsen SS, Schrenk D, Turck D, Younes M, Benfenati E, Castle L, Cedergreen N, Hardy A, Laskowski R, Leblanc JC, Kortenkamp A, Ragas A, Posthuma L, Svendsen C, Solecki R, Testai E, Dujardin B, Kass GE, Manini P, Jeddi MZ, Dorne JC, Hogstrand C (2019) Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. *EFSA J* 17(3):77.
43. Irene de la Casa-Resino, Michael T. Empl, Sara Villa, Boris Kolar, Julia Fabrega, Adam D. Lillicrap, Xanthippos N. Karamanlis & Ricardo Carapeto-García, Environmental risk assessment of veterinary medicinal products intended for use in aquaculture in Europe: the need for developing a harmonised approach, *Environmental Sciences Europe* 33, 84 (2021).
44. Fabrega, J., Carapeto, R. Regulatory review of the environmental risk assessment of veterinary medicinal products in the European Union, with particular focus on the centralised authorisation procedure. *Environ Sci Eur* 32, 99 (2020).
45. Haupt, R., Heinemann, C., Hayer, J.J. et al. Critical discussion of the current environmental risk assessment (ERA) of veterinary medicinal products (VMPs) in the European Union, considering changes in animal husbandry. *Environ Sci Eur* 33, 128 (2021).
46. de la Casa Resino I., Haro Castuera A., Casimiro Elena R., Rubio Montejano C., Carapeto García R., European legislation for veterinary medicines: Would a monographs system improve the environmental risk assessment? *Integr Environ Assess Manag* 17, 2021, Number 6, pp. 1274-1285.
47. Mancini L., Lacchetti I., Chiudioni F. et al. Need for a sustainable use of medicinal products: environmental impacts of ivermectin *Ann Ist Super Sanità* 2020 | Vol. 56, No. 4: 492-496, DOI: 10.4415/ANN_20_04_12
48. V. Zambrano J. et al. Removal of a mixture of veterinary medicinal products by adsorption onto a *Scenedesmus almeriensis* microalgae-bacteria consortium *Journal of Water Process Engineering* 43 (2021) 102226
49. Sebestyén I., Monostory K., Hirka G. Environmental risk assessment of human and veterinary medicinal products - Challenges and ways of improvement *Microchemical Journal*, 136 (2018) – 67-70, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.08.012> Elsevier
50. Chapman J., Porsch L., Vidaurre R., Backhaus T., Sinclair C., Jones G., Boxall A., Three methods for integration of environmental risk into the benefit-risk assessment of veterinary medicinal products, *Science of The Total Environment*, Volumes 605–606, 2017, 692-701, ISSN 0048-9697.

51. Kolar B., Finizio A., Assessment of environmental risks to groundwater ecosystems related to use of veterinary medicinal products, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Volume 88, 2017, 303-309, ISSN 0273-2300.
52. Richter, E., Berkner, S., Ebert, I., et al. Results of extended plant tests using more realistic exposure scenarios for improving environmental risk assessment of veterinary pharmaceuticals. *Environ Sci Eur* 28, 22 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0089-2>.
53. Nikola Rakonjac, Sjoerd E.A.T.M. van der Zee, Louise Wipfler, Erwin Roex, Hans Kros, Emission estimation and prioritization of veterinary pharmaceuticals in manure slurries applied to soil, *Science of the Total Environment*, Volume 815, 1 April 2022, 152938.
54. Backhaus, T. Environmental Risk Assessment of Pharmaceutical Mixtures: Demands, Gaps, and Possible Bridges. *AAPS J* 18, 804–813 (2016).
55. Mahefarisoa K.L., Simon Delso N., Zaninotto V., Colin M.E., Bonmatin J.M., The threat of veterinary medicinal products and biocides on pollinators: A One Health perspective, *One Health*, Volume 12, 2021, 100237, ISSN 2352-7714, <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100237>.
56. Alistair B. A. BOXALL, Paul Johnson, Edward J. Smith, Chris J. Sinclair, Edward Stutt, Len S. Levy, Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants, *2288 J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 2288-2297.
57. EL-Kholy H., Kemppainen B., Ravis W., Hoerr F., Pharmacokinetics of levamisole in broiler breeder chickens, *J. vet. Pharmacol. Therap.* 29, 49-53, 2006.
58. Bogan J.A., Marriner S.E., Galbraith E.A., Pharmacokinetics of levamisole in sheep, *Research in Veterinary Science*, Volume 32, Issue, 1982, pages 124 -126.
59. El-Kholy H., Kemppainen B., Ravis W., Hoerr F., Pharmacokinetics of levamisole in broiler breeder chickens, *J Vet Pharmacol Ther*, 2006 Feb;29(1):49-53.
60. Published on behalf of Commission of the European Communities, *Veterinary drug residues, Residues in food producing animals and their products: Reference Materials and Methods*, Second Edition, Edited by R.J.Heitzman, Science, Research and Development EC Brussels.
61. Galtier P., Escoula L., Alvinerie M., Pharmacokinetics of [3H]levamisole in pigs after oral and intramuscular administration, *Am J Vet Res*, 1983 Apr;44(4):583-7.
62. Hess C., Ritke N., Broecker S., Madea B., Musshoff F, Metabolism of levamisole and kinetics of levamisole and aminorex in urine by means of LC-QTOF-HRMS and LC-QqQ-MS, *Anal Bioanal Chem.*, 2013 May;405(12):4077-88. doi: 10.1007/s00216-013-6829-x. Epub 2013 Feb 24.
63. Viviana Carmen Ciucă, Carmen Otilia Rusănescu, Victor Viorel Safta, Research on the Removal of Levamisole Residues in Bovine Ovine, Caprine, Porcine and Poultry Tissues, *Separations* 2022, 9, 261.
64. Mirta Zrnčić, Meritxell Gros, Sandra Babić, Marija Kaštelan-Macan, Damia Barcelo, Mira Petrović, Analysis of anthelmintics in surface water by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry, *Chemosphere*, Volume 99, Pages 1-278 (March 2014).
65. Horvat A.J.M., Babić S., Pavlović D.M., Ašperger D., Pelko S., Kaštelan-Macan M., Petrović M., Mance A.D., Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 31, January 2012, Pages 61-84.
66. Valeria Di Nica, Luca Menaballi, Giovanna Azimonti, Antonio Finizio, RANKVET: A new ranking method for comparing and prioritizing the environmental risk of veterinary pharmaceuticals, *Ecological Indicators*, May 2015, Pages 270-276
67. Boxall A.B.A, *Risks of Pharmaceuticals in Terrestrial Systems*, The University of York, *Toxicol. Lett.* 2002.
68. Tolls, J., Sorption of veterinary pharmaceuticals—a review. *Envir. Sci. Tech.* 35, 3397–3406, 2001.

69. Wollenberger, L., Halling Sorensen, B., and Kusk, K. O., Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 40, 723–730, 2000.
70. Alistair B. A. Boxall, Dana W. Kolpin, Henkel Kгаа, Are veterinary medicines causing environmental risks?, *Environ Sci Technol*, 2003 Aug 1, 37(15), 286A-294A.
71. Elisabeth Richter, Silvia Berkner, Ina Ebert, Bernhard Förster, Nadin Graf, Monika Herrchen, Ute Kühnen², Jörg Römbke and Markus Simon, Results of extended plant tests using more realistic exposure scenarios for improving environmental risk assessment of veterinary pharmaceuticals, Richter et al. *Environ Sci Eur* (2016) 28:22, DOI 10.1186/s12302-016-0089-2
72. Jennifer H., Olker U.S. Environmental Protection Agency (august 2022) ECOTOX user guide: ecotoxicology database system. Version 5.5).
73. EMA (martie 2011) Guideline on determining the fate of veterinary medicinal products in manure, EMA/CVMP/ERA/430327/2009.
74. Environmental Assessment Supplement To Nada 139-472 DENAGARD (tiamulin) Premixes.
75. Blackwell P.A., Boxall A.B.A., Kay P., Noble H., Evaluation of a lower tier exposure assessment model for veterinary medicines. *J Agric Food Chem*, 2005, 53:2192–2201.
76. Kumar K., Gupta S.C., Baidoo S.K., Chander Y., Rosen C.J. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *J Environ Quality*, 34:208, 2005.
77. Montforts M.H.M.M., The trigger values in the environmental risk assessment for veterinary medicines in the European Union: a critical appraisal, RIVM report 601500002/2005.
78. Jensen J., Krogh P.H, Sverdrup LE., Effects of the antibacterial agents tiamulin, olanquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrate species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae), *Chemosphere*, 2003, volume 50, 3, 437-443
79. European Communities, 2003, Technical guidance document on Risk Assessment in support of Commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) No. 1488/94 on risk assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market.
80. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) Federal Office of Consumer Protection and Food Safety, Mauerstraße 39-42, 10117 Berlin, Germany, Decentralised procedure, publicly available assessment report for a veterinary medicinal product, 2018.
81. Boxall A.B., Oakes D., Ripley P., Watts C.D., The application of predictive models in the environmental risk assessment of ECONOR, *Chemosphere*, 2000 Apr;40(7):775-81.
82. Bazele farmaceutice ale practicii medical, Stroescu V., 1998 –. Editia a VI-a.
83. Tiamulin hydrogen fumarate presented as premix for medicated feeding stuff and oral powder for in-feed use to be administered to pigs, 2021, EMA/649279/2020, Veterinary Medicines Division.
84. Perruchon C., Katsivelou E., Karas P.A., Vassilakis S., Lithourgidis A.A., Kotsopoulos T.A., Sotiraki S., Vasileiadis S., Karpouzas D.G., Following the route of veterinary antibiotics tiamulin and tilmicosin from livestock farms to agricultural soils, *Journal of Hazardous Materials Volume* 429, 5 May 2022, 128293.
85. Product Name: Denagard 10% Premix for Medicated Feed for Pigs, Chickens, Turkeys and Rabbits, MA Holder: Elanco Europe Ltd.
86. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Konstantinos Koutsoumanis, Ana Allende, Avelino Alvarez-Ordóñez, Declan Bolton, Maximum levels of cross-contamination for 24 antimicrobial active substances in non-target feed. Part 8: Pleuromutilins: tiamulin and valnemulin, *EFSA Journal*, Volume 19, Issue 10, 2021.

87. Dorota Krasucka, Agata Mitura, Wojciech Cybulski, Katarzyna Kos, Wojciech Pietro, Tiamulin hydrogen fumarate - veterinary uses, *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research*, Vol. 67 No. 6 pp. 682ñ685, 2010.
88. Howard D., Cowen T., Determination of tiamulin hydrogen fumarate in animal feeds using high-performance liquid chromatography, *Analyst*, 1982, Issue 1272, Page 241-352.
89. Cao, X.J., Sun, C.R., Pan, Y.J., Tiamulin-hydrogen fumarate-methanol, 2004, 60, O1546-O1548.
90. Viviana Carmen Ciucă, Carmen Otilia Rusănescu, Victor Viorel Safta, Analysis of Transfer of Tiamulin to Animal Tissue after Oral Administration: An Important Factor for Ensuring Food Safety and Environmental Protection, *Pharmaceuticals*, 2023, 16, 3, 387.
91. Carraschi S.P., Shiogiri N.S., Venturini F.P., Acute Toxicity and Environmental Risk of Oxytetracycline and Florfenicol Antibiotics to Pacu (*Piaractus mesopotamicus*, *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 37(2): 115 - 122, 2011.
92. Silvia Patrícia Carraschi, Taise Florêncio, Nathália Garlich, Adilson Ferreira da Silva, Aline Marcari Marques, Claudinei da Cruz and Maria José Tavares Ranzani Paiva, Ecotoxicology of drugs used in fish disease treatment *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, Vol. 7(3), pp. 31-36, April, 2015.
93. Haihong Hao, Guyue Cheng, Zahid Iqbal , Xiaohui Ai , Hafiz I. Hussain, Lingli Huang, Menghong Dai , Yulian Wang , Zhenli Liu and Zonghui Yuan, Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals, *Front. Microbiol.*, 12 June 2014, Sec. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy ,Volume 5 – 2014.
94. Wenjin Ma, Lei Wang, Xiangyue Xu, Meixia Huo, Kaixiang Zhou, Kun Mi, Xiaoyuan Tian, Guyue Cheng , Lingli Huang , Fate and exposure risk of florfenicol, thiamphenicol and antibiotic resistance genes during composting of swine manure, *Sci Total Environ.* 2022 Sep15;839:156243.
95. Cristiano Campos Mattioli, Bruna Milke Chiste, Natalia Akemi Takeshita, Claudio Martin Jonsson, Vera Lucia Ferracini, Hamilton Hisano, Acute Toxicity and Risk Assessment of Florfenicol for Nile Tilapia Larvae, *Bull Environ Contam Toxicol.* 2020 Nov;105(5) :721-727.
96. Viviana Ciuca, Environmental assessment for Florfenicol FP 10%, *Medicamentul Veterinar / Veterinary Drug*, Vol. 12(1) June - July 2018.
97. Dong S., Ding Y., Feng H., Xu J., Han J., Jiang W., Xia Y., Wang A, Source preventing mechanism of florfenicol resistance risk in water by VUV/UV/sulfite advanced reduction pretreatment *Water Research*, Volume 235, 15 May 2023, 119876.
98. Zhang T., Ding Y., Peng J., Dai Y., Luo S., Liu W., Yi Ma, Effects of Broad-Spectrum Antibiotic (Florfenicol) on Resistance Genes and Bacterial Community Structure of Water and Sediments in an Aquatic Microcosm Model, *Antibiotics* 2022, 11, 10, 1299.
99. Finding of No Significant Impact for AQUAFLO (Florfenicol) 50% Type A Medicated Article for Catfish, Attachment: January IS, 2004 EA.
100. Agatino Di Paola, Maurizio Addamo, Vincenzo Augugliaro, Elisa Garc'ia-Lopez, Vittorio Lodo, Giuseppe Marc and Leonardo Palmisano, Photodegradation of Lincomycin in Aqueous Solution, *International Journal of Photoenergy*, Volume 2006, Article ID 47418, Pages 1–6.
101. Kuchta S.L., Cessna A.J., Lincomycin and Spectinomycin, persistence in liquid swine manure and their transport from manure-amended soil, *Toxicology Graduate Program Toxicology Centre University of Saskatchewan*, *Arch Environ Contam Toxicol* 2009 Jul;57(1):1-10.
102. Roberto Andreozzia, Marisa Canterinoa, Roberto Lo Giudiceb, Raffaele Marottaa, Gabriele Pintob, Antonino Polliob, Lincomycin solar photodegradation, algal toxicity and removal from wastewaters by means of ozonation, *Water Research* 40 (2006), 630-638.
103. Sandra L. Kuchta, Allan J Cessna, Fate of lincomycin in snowmelt runoff from manure-amended pasture, *Chemosphere* 76(4):439-446, July 2009.

104. Anne Mehrrens , Tobias Licha , Victoria Burke , Occurrence, effects and behaviour of the antibiotic lincomycin in the agricultural and aquatic environment- A review, *Science of the Total Environment*, Volume 778, 15 July 2021, 146306.
105. Bo Cheng, Fen Jiang, Meile Su, Liqun Zhou, Hua Zhang, Zigang Cao, Xinjun Liao, Guanghua Xiong , Juhua Xiao , Fasheng Liu , Huiqiang Lu , Effects of lincomycin hydrochloride on the neurotoxicity of zebrafish, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 201, 15 September September 2020, 110725.
106. Peiyi Li, Yizhao Wu, Yali Wang, Jiangping Qiu, and Yinsheng Li, Behaviour of the Veterinary Drugs Lincomycin, Monensin, and Roxarsone and Their Toxicity on Environmental Organisms, *Molecules*, 2019 Dec; 24(24): 4465.
107. Xuefang Zhu , Xun Wang , Lanlan Wang , Xueting Fan , Xiaohong Li , Yucheng Jiang, Biodegradation of lincomycin in wastewater by two-level bio-treatment using chloroperoxidase and activated sludge: Degradation route and eco-toxicity evaluation, *Environmental Technology & Innovation*, Volume 20, November 2020, 101114
108. Mengmeng Wang, Chen Cai, Bo Zhang, Huiling Liu, Characterization and mechanism analysis of lincomycin biodegradation with *Clostridium* sp. strain LCM-B isolated from lincomycin mycelial residue (LMR), *Chemosphere*, Volume 193, February 2018, Pages 611-617.
109. Guo, Jiahua, Selby, Katherine and Boxall, Alistair B A, Assessment of the Risks of Mixtures of Major Use Veterinary Antibiotics in European Surface Waters, *Environmental science & technology*.pp. 8282-8289, 2016, ISSN 1520-5851.
110. C. F. Williams, J. E. Watson, S. D. Nelson, and C. W. Walker, Sorption/Desorption of Lincomycin from Three Arid-Region Soils, *Journal of Environmental Quality*, 2013
111. Ana Barreiro,,Raquel Cela-Dablanca1,Carolina Nebot, Lucía Rodríguez-López,Vanesa Santás-Miguel, Manuel Arias-Estévez, María Fernández-Sanjurjo, Avelino Núñez-Delgado1 and Esperanza Álvarez-Rodríguez, Occurrence of Nine Antibiotics in Different Kinds of Sewage Sludge, Soils, Corn and Grapes After Sludge Spreading, *Span. J. Soil Sci.*, 26 September 2022.
112. Marlies Bergheim, Richard Gminski, Bernd Spangenberg, Malgorzata Debiak, Alexander Bürkle, Volker Mersch-Sundermann, Klaus Kümmerer, Reto Gieré, Antibiotics and sweeteners in the aquatic environment: biodegradability, formation of phototransformation products, and in vitro toxicity, *Environmental Science and Pollution Research*; 22, 2015, 22, 18017-18030.
113. Gerling S., Blümlein K., Berger M., Neuhoff J., Göen T., Hartwig A., MAK Commission: Ciprofloxacin, enrofloxacin, lincomycin, penicillin G, and penicillin V- Determination of selected antibiotics in urine by LC-MS/MS, *The MAK Collection for Occupational Health and Safety* 2022, Vol 7, No 4.
114. Hala Abou El-Hassayeb, Effects of Antibiotics on Marine Benthic Algae, *Multi-Knowledge Electronic Comprehensive Journal For Education And Science Publications (MECSJ)*, Issue (21), July (2019).
115. Paola Grenni, Valeria Ancona, Anna Barra Caracciolo, Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review, *Microchemical Journal* ,Volume 136, January 2018, Pages 25-39.
116. Rafael Grossi Botelho, Sérgio Henrique Monteiro and Valdemar Luiz Tornisielo, *Veterinary Antibiotics in the Environment, Emerging Pollutants in the Environment*, 2015.
117. Emmanuel Sunday Okeke, Kingsley Ikechukwu Chukwudozie, Raphael Nyaruaba, Richard Ekeng Ita, Abiodun Oladipo, Onome Ejeromedoghene, Edidiong Okokon Atakpa, Chidozie Victor Agu& Charles Obinwanne Okoye, Antibiotic resistance in aquaculture and aquatic organisms: a review of current nanotechnology applications for sustainable management, *Environmental Science and Pollution Research* volume 29, pages69241–69274, 2022.

118. Brandis G., Larsson, J., Elf J., Antibiotic perseverance increases the risk of Gerrit Brandis, Jimmy Larsson, and Johan Elf, Antibiotic perseverance increases the risk of resistance development, *Microbiology*, 2023, 120 (2) e2216216120.
119. Simon M., Herrchen M., Graf N., Förster B., Römbke J. Concept development for an extended plant test in the environmental risk assessment of veterinary medicinal products, UBA-Texte15/2015, Report No. (UBA-FB) 002048/E, Project No. (FKZ) 3711 63 424.
120. Z.H. Li, T. Randak, Residual pharmaceutically active compounds (PhACs) in aquatic environment – status, toxicity and kinetics: a review, *Veterinari Medicina*, 52, 2009 (7): 295–314.
121. Ajit K. Sarmah, Michael T. Meyer, Alistair B.A. Boxall , A global perspective on the use, sales exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment, *Chemosphere* 65 (2006), 725-759.
122. Fabrice Martin-Laurent, Edward Topp, Loren Billet, Isabelle Batisson, Cédric Malandain, Pascale Pascale Besse, P. Besse-Hoggan Besse-Hoggan, Soizic Morin, Joan Artigas, Chloé Bonnineau, Laura Kergoat, et al, *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26 (18), pp.18930-18937.
123. Public Assessment Report discussion L-SPEC Lincomycin Spectinomycin Update:2017.
124. Jun Hu; Yong Liang; Minjie Chen; Xiaorong Wang, Assessing contamination levels of amprolium and tylosin using the embryo toxicity assay and three biomarkers, *Aquatic Ecosystem Health & Management* (2010) 13 (3): 335–341.
125. Samah Ali, Abeer Abdelhalim, Removal of amprolium from water by roots and seeds ash of *Salvadora persica*, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, Volume 102, 2022 - Issue 18, Pages 1604-1612 | Received 20 Aug 2020.
126. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Guido Rychen, Gabriele Aquilina, Giovanna Azimonti, Vasileios Bampidis, Maria de Lourdes Bastos, Georges Bories, Andrew Chesson, Pier Sandro Cocconcelli, Gerhard Flachowsky, Boris Kolar, Maryline Kouba, Marta Lopez-Alonso, Secundino Lopez Puente, Alberto Mantovani, Baltasar Mayo, Fernando Ramos, Maria Saarela, Roberto Edoardo Villa, Robert John Wallace, Pieter Wester, Paul Brantom, Ingrid Halle, Patrick van Beelen, Orsolya Holczknecht, Maria Vittoria Vettori and Jurgen Gropp, Safety and efficacy of COXAM® (amprolium hydrochloride) for chickens for fattening and chickens reared for laying, *ej EFSA Journal*, 2018.
127. Vasileios Bampidis, Giovanna Azimonti, Maria de Lourdes Bastos, Henrik Christensen, Maria Vittoria Vettori, Efficacy of the feed additive consisting of amprolium hydrochloride (COXAM®) for use in chickens for fattening and chickens reared for laying (Huvepharma N.V.) March 2021 *EFSA Journal* 19(3).
128. Kostas Koutsoumanis, Ana Allende, Luísa Peixe, Avelino Alvarez-Ordóñez's, Declan J Bolton Maximum levels of cross-contamination for 24 antimicrobial active substances in non-target feed. Part 3: Amprolium, October 2021, *EFSA Journal* 19(10)
129. Halling-Sørensen B., Nielsen S.N., Jensen J., Environmental Project no. 659, 2002, Environmental Assessment of Veterinary Medicinal Products in Denmark, Toxic effects of medical compounds on the environment.
130. Rathinam T., Chapman H. D., Avian Diseases, Sensitivity of Isolates of *Eimeria* from Turkey Flocks to the Anticoccidial Drugs Amprolium, Clopidol, Diclazuril, and Monensin, Vol. 53, No. 3, (Sep., 2009), pp. 405-408.
131. French agency for food, environmental and occupational health safety– French Agency for Veterinary Medicinal Products, Decentralised procedure publicly available assessment report for a veterinary medicinal product surricox 400 mg/ml solution for use in drinking water for veterinary

medicinal product surricox 400 mg/ml solution for use in drinking water for a chickens, turkeys, ducks and guinea fowls, date: 05/02/2021.

132. Veterinary Medicines Directorate, United Kingdom, Woodham Lane New Haw Addlestone Surrey KT15 3LS National procedure, Publicly available assessment report for a veterinary medicinal product Amprol 12% w/v Solution for Use in Drinking Water, July 2016.
133. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) , Guido Rychen, Gabriele Aquilina, Giovanna Azimonti, Vasileios Bampidis , Safety and efficacy of COXAM (amprolium hydrochloride) for chickens for fattening and chickens reared for laying, July 2018.
134. U.S. Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine.
135. Conrad Marx, Viktoria Mühlbauer, Peter Krebs, Volker Kuehn, Environmental risk assessment of antibiotics including synergistic and antagonistic combination effects, *Science of the Total Environment* 524–525, 2015, 269–279.
136. Isabel T. Carvalho, Lúcia Santos, Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario, *Environment International* 94, 2016, 736-757.
137. Louis Anthony Tony Cox Jr ., Douglas A Popken, Jeremy J Mathers, Human health risk assessment of penicillin/aminopenicillin resistance in enterococci due to penicillin use in food animals, *Risk Anal.* 2009 Jun;29(6):796-805. doi: 10.1111/j.1539-6924.2009.01202.x.
138. Li D., Yang M., Hu J., Zhang Y., Chang H., Jin F.. Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river, *AGRIS* since: 2013, Volume: 42 issue 1-2.
139. Joshi S., Sharma A., Rawat M.S.M., Dhiman C., Development of conditions for rapid thin layer chromatography of β -lactam antibiotics, *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 22, 435-437, 2009.
140. Rao R.N., Venkateswarlu, N., Narsimha, R., Determination of antibiotics in aquatic environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography– electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1187, 151–164, 2008.
141. Veterinary manual–MERCK
142. Lei BL, Huang SB, Jin XW, Wang Z., Deriving the aquatic predicted no-effect concentrations (PNECs) of three chlorophenols for the Taihu Lake, China. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering.* 45(14):1823-31, 2010.
143. Predicted No Effect Concentration. 2015. Greenfacts.
144. Editor David M. Whitacre, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Volume 218 , ISSN 0179-5953, 2012, Springer.
145. Boxall, A.B.A., Kolpin, D.W., Halling-Sørensen, B., Tolls, J. 2003. Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ. Sci. Technol.* 37, 286A–294A
146. Díaz-Cruz, M.S., De Alda, M.J.L., Barceló, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 22, 340–351, 2003.
147. Kümmerer, K. Antibiotics in the aquatic environment—A review—Part I. *Chemosphere*, 75, 417–434, 2009.
148. Ciuca V.C., Safta V.V., Cristina R.T. - Algorithm for calculating predictable concentrations (PEC) for environmental risk assessment of veterinary medicinal products - *Veterinary Drug*, Vol. 12(2) December 2018, National Association of Manufacturers of Veterinary Products in Romania (ANFPUVR), P-ISSN 1843 - 9527, E-ISSN 2069-2463.
149. Viviana Ciuca, V. V. Safta, Romeo T. Cristina, Algorithm for the calculus of non effective predictable concentration (PNEC) for evaluation of the environmental risk of the veterinary

- medicinal products, *Veterinary Drug*, Vol. 13 (1) 2019, National Association of Manufacturers of Veterinary Products in Romania (ANFPUVR), ISSN 2069-2463.
150. WHO, 2019. Critically important antimicrobials for human medicine, 6th Revision 2018.
 151. Zhang, Y. Li, W. Blending antibiotic resistance into environmental risk assessment of antibiotics: A case study in coastal waters of the Bohai Bay, China. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 2019, 25(6), 1406-1421.
 152. Commission Decision 2002/657/EC, 2002. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Communities* 8–36.
 153. Boxall A.B., Fogg L.A., Blackwell P.A., Kay P., Pemberton E.J., Croxford A., *Veterinary medicines in the environment*, *Rev Environ Contam Toxicol.* 2004, 180,1-91.
 154. Ciucă Viviana-Carmen, Burghilea Victorița, Safta V.V., Niță Despina, Paraschiv Luciana, *Mathematical modeling for benzylpenicilin potassium and streptomycin sulphate potency determination of Ascomicin-Veterinary Drug* Vol. 10 (2) 2016, National Association of Manufacturers of Veterinary Products in Romania (ANFPUVR), ISSN 2069-2463.
 155. Batt A.L., Aga D.S., Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination. *Analytical Chemistry* 77, 2940-2947, 2005.
 156. Benito-Peña E., Partal-Rodera A.I., León-González M.E., Moreno-Bondi M.C., Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection. *Analytica Chimica Acta* 556, 415- 422, 2006.
 157. Grujić S., Vasiljević T., Laušević M., Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 4989-5000, 2009.
 158. Viviana Ciuca, Valer Teusdea, Victorita Burghilea, V. V. Safta, Daniela Nita, Environmental impacts of veterinary antibiotics, *Veterinary Drug/Medicamentul Veterinar* Vol. 10 (2) 2016, Asociația Națională a Fabricanților de Produse de Uz Veterinar din România (ANFPUVR), ISSN 2069-2463.
 159. Mónica Díaz-Bao, Rocío Barreiro, José Manuel Miranda, Alberto Cepeda, and Patricia Regal, Fast HPLC-MS/MS Method for Determining Penicillin Antibiotics in Infant Formulas Using Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction, *J Anal Methods Chem.* 2015; 2015: 959675.
 160. Mengmeng Zhong, Tielong Wang, Jun Huang, and Gang Yu, Meiling Lu, Automated Online SPE-UHPLC/MS/MS Analysis of Emerging Pollutants in Water, Simultaneous quantification of contaminants in environmental water matrices, *Application Note Environmental*
 161. Rehm S, Rentsch K.M., LC-MS/MS method for nine different antibiotics, *Clinica Chimica Acta*, Volume 511, December 2020, Pages 360-367.
 162. Bettina Schuhn Thomas Glauner, Online SPE Analysis of Pharmaceutical Compounds in Environmental Waters , The Agilent 1200 Infinity Series Online SPE Solution
J. Srinivasa Rao , Vejendla.Ravikumar , Ravali Nacham, Varnalatha Kachakayala, Kalpana.K, Rapid uplc method for simultaneous estimation of sulfamethoxazole and trimethoprim in pharmaceutical dosage forms, *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 2013.
 163. You-yu Liu, Xia-lin Hu, Yi-fan Bao, Da-qiang Yin, Simultaneous determination of 29 pharmaceuticals in fish muscle and plasma by ultrasonic extraction followed by SPE-UHPLC-MS/MS, *Journal of Separation Science*, 2018, 41(10):2139-2150.

164. Paíga P., Santos L.H.M.L.M., Delerue-Matos C., Development of a multi-residue method for the determination of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in aqueous environmental matrices by SPE-UHPLC–MS/MS, *J Pharm Biomed Anal*, 2017 Feb 20;135:75-86.
165. Straub J.O., An Environmental Risk Assessment for Human-Use Trimethoprim in European Surface Waters, *Antibiotics* 2013, 2(1), 115-162.
166. Farrelly, E. Florfenicol Acute toxicity to the earthworm *Eisenia foetida*. Schering-Plough Report No.: 30817, 1999b.
167. Carter, J.N., Florfenicol effects on soil non-target microorganisms: nitrogen transformation, carbon transformation. Schering-Plough Report No. 42754, 2002.
168. Gallagher, S. P., Kendall, T. Z., and Krueger, H. O., Florfenicol: A 96-hour toxicity test with the freshwater alga (*Anabaena flos-aquae*). Schering-Plough Research Institute Study No.: 07119, 2008a.
169. Gallagher, S. P., Kendall, T. Z., and Krueger, H. O., Florfenicol: A static-renewal life-cycle toxicity test with the cladoceran *Daphnia magna*. Schering-Plough Research Institute Study No.: 07134, 2008b.
170. Gray, J., Florfenicol terrestrial (non-target) plant growth test, seedling emergence Study No. ESN 0238/064016. Schering-Plough Report No.: 49956, 2007.
171. Bealing, D. J., Brice, A., Feehan, M., Florfenicol: terrestrial plants, growth test, Schering-Plough Report No. 38036, 1999.
172. Bradley, M.J., Florfenicol – Toxicity test with the sediment-dwelling midge (*Chironomus riparius*) under static conditions, following OECD Guideline 219, Springborn Smithers Study No. 1560.6220, Schering-Plough Research Institute Study No. 08317, 2009.
173. Serna Calleja M.A., Bolado S., Jiménez J.J., Lopez-Serna, R. Performance critical comparison of offline SPE, online SPE, and direct injection for the determination of CECs in complex liquid environmental matrices, *The Microchemical Journal*, Volume 187, April 2023, 108395.
174. Kraupner N., Ebmeyer S., Hutinel M., Fick J., Flach C.F., Joakim Larsson D.G., Selective concentrations for trimethoprim resistance in aquatic environments, *Environment International*, Volume 144, November 2020, 106083.
175. Carvalho, I.T.; Santos, L. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environ. Int.* 2016, 94, 736–757.

ABREVIERI

EMEA - Agenția Europeană a Medicamentului

PMV - produs medicinal veterinar

SPE-online-UHPLC-MS/MS - extracția în fază solidă online (SPE) cromatografie lichidă de ultra-înaltă performanță cuplată la un spectrometru de masă cu triplu cvadropol (UHPLC-MS/MS)

ERA - evaluarea riscului de mediu

CVMP - Comitetul pentru produse medicamentoase de uz veterinar

EPAR - Raportul public european de evaluare

ERAWP - Grupul de lucru pentru evaluarea riscurilor de mediu

VICH - Conferința internațională veterinară de armonizare

ECHA - Agenția Europeană pentru Produse Chimice

TGD - Document de orientare tehnică

UE – Uniunea Europeană

PEC - Concentrația estimată în mediu

PNEC - Concentrația predictibilă fără efect

FA - factor de evaluare

PECapă freatică - Concentrația estimată în apa freatică

Koc - coeficientului de distribuție apă-carbon organic

PECapă de suprafață - Concentrația estimată în apa de suprafață

PEC sediment - Concentrația estimată în sediment

Ksed-apa - coeficientul de partiție sediment-apa

EC50 - concentrația medie efectivă

LC50 - concentrația medie letală

NOEC - concentrația fără efecte observate

EC10 - concentrația efectivă

OECD - Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică

R – Riscul de mediu

Rraf - riscul de mediu rafinat

ONU - Organizația Națiunilor Unite

OMS - Organizația Mondială a Sănătății

EFSA - Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară

GMP - Bune practici de fabricație

BAT - Cele mai bune tehnici disponibile

NVR - noul regulament veterinar

IVM – ivermectina

TET – tetracilină

CIP – ciprofloxacina

SDZ – sulfadiazina

SMX – sulfametoxazol

SEM - microscopie electronică cu scanare

FTIR - spectroscopie în infraroșu cu transformare Fourier

UHPLC-MS/MS - cromatografie lichidă de ultra performanță

ICBMV - Institutul de control al produselor biologice și medicamentoase veterinare

DT 50 - Timpul necesar pentru ca concentrația chimică să scadă la 50% din cantitatea la aplicare

Kow - coeficientul de partitie octanol-apa

DT90 – persistența în sol

Kd - coeficientul de distribuție solid-apă

ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ

Lucrări publicate în perioada stagiului doctoral

Lucrări publicate în jurnale indexate ISI

Viviana Ciuca, Safta Victor Viorel, Rusanescu Carmen Otilia, Paraschiv Gigel, Deak Gyorgy, Ilie Mihaela, Cananau Sorin, Rapid Environmental Impact Assessment of Penicillin G in an Veterinary Product Using an Original Software Method and Monitoring by SPE-Online-UHPLC-MS/MS. *Molecules*, Volume 28, Issue 17, , DOI 10.3390/molecules 28176227, Accession Number MEDLINE:37687057, eISSN 1420-3049, **F.I. 4.6**

- Capitol in carte de specialitate publicata la editura internationala:
Liquid Chromatography in Analysis of Bioactive Compounds for Pharmaceuticals, Cosmetics, and Functional Food Interest, Editors Jan Oszmianski Sabina Lachowicz-Wisniewska, Published: November 2023, Pages: 320, ISBN 978-3-0365-9229-9 (hardback); ISBN 978-3-0365-9228-2 (PDF)

Viviana Ciuca, C.O.Rusanescu, V.V. Safta, Analysis of Transfer of Tiamulin to Animal Tissue after Oral Administration: An Important Factor for Ensuring Food Safety and Environmental Protection, *Pharmaceuticals*, 16, 3, 387, 2023, Special Issue Liquid Chromatography in Analysis of Bioactive Compounds for Pharmaceuticals, Cosmetics, and Functional Food Interest), section "Natural Products".
accesion number: CCC:000960269700001, <https://www.webofscience.com/wos/alldb/full-record/CCC:000960269700001>, **F.I. 5.215**

Viviana Ciuca, C.O.Rusănescu, V.V.Safta, Research on the Removal of Levamisole Residues in Bovine, Ovine, Caprine, Porcine and Poultry Tissue, *Separations* vol. 9, Issue 9, 2022, Special Issue Applications of Chromatography Technology, eISSN 2297-8739, <https://www.webofscience.com/wos/alldb/full-record/WOS:000857757300001>, **F.I. 3.344**.

Safta V.V., **Viviana Ciucă**, Voicu G., Microbiological monitoring of water supply by intestinal enterococci using the membrane filtration method, *Fresenius Environmental Bulletin*, 2021, 30 (7), 8252-8259, ISSN1018-4619, **F.I. 0.618**, WOS 000675912500031.

Lucrare publicata la conferinta internationala

E. Marin, D. M. Marin, V. V. Safta, C. O. Rusănescu, G. Paraschiv, **Viviana Ciucă**. Wastewater management from the municipality of Alexandria, Teleorman county, p.288-293, ISB-INMATEH Agricultural and mechanical engineering, Print: ISSN 2344-4118 CD-ROM: ISSN 2344-4126 Online: ISSN 2537-3773, BDI.

Viviana Ciuca, Validation studies for determination of nitrogenprotein from biological products by Kjeldahl method, USAMVB, Timișoara, SCIENTIFICAL PAPERS VETERINARY MEDICINE VOLUMUL LII (2) 2019 Editor: IMPRIMERIA MIRTON, Timisoara, Romania ISSN: -1221-5295

Dinculoiu, M. Ciobanu, C.O.Rusănescu, **Viviana Ciuca**, M. Begea, A. M.Tabarasu, S. Iordache, Study on the anthropic impact on the environment, 106-115, ISB-INMATEH AGRICULTURAL AND MECHANICAL ENGINEERING 2022, Print: ISSN 2344-4118, CD-ROM: ISSN 2344-4126, Online: ISSN 2537-3773, <https://isbinmateh.inma.ro/wp-content/uploads/2023/04/Vol-ISB-INMA-TEH-2022-final.pdf>, indexare Copernicus.

Lucrări publicate în jurnale indexate BDI

Viviana Ciuca, V. V. Safta, Romeo T. Cristina, algorithm for the calculus of non effective predictable concentration (PNEC) for evaluation of the environmental risk of the veterinary medicinal products,

Veterinary Drug/Medicamentul Veterinar Vol. 13 (1) 2019, Asociația Națională a Fabricanților de Produse de Uz Veterinar din România (ANFPUVR), ISSN 2069-2463, BDI.

Viviana Ciuca, V.V. Safta, Metodologia evaluării riscului pentru mediu a produselor medicinale veterinare asistată de computer, Oferta cercetării științifice pentru transfer tehnologic în agricultură, industria alimentară și silvicultură, publicată de Ministerul Agriculturii și Dezvoltării rurale – Academia de Științe Agricole și Silvicultură ”Gheorghe Ionescu – Sisești”, 2019, Coordonator: Prof. Univ. Emerit Dr. Ing. Dr. H.C. Valeriu Tabără, vol., 2019, Editura Ceres, București, ISSN 1844-0355, 22: 189-192.

Lucrare în curs de publicare în Buletinul U.P.B.

Marin E., Rusanescu C.O., Paraschiv.G, **Viviana Ciucă**, Research on wastewater treatment using activated sludge technology in the anaerobic-anoxic-aerobic.

A fost recenzată, acceptată și este în curs de publicare la Revista Scientific Bulletin, Series B, Chemistry and Materials Science, ISSN 1454 -2331.



Universitatea Națională de Știință și Tehnologie
POLITEHNICA București

Adresa: Spl. Independenței nr. 313, București - 060032, ROMÂNIA
Telefon: (+ 4021) 402.94.85; Fax: (+ 4021) 310.30.10

Lucrarea: “RESEARCH ON WASTEWATER TREATMENT USING ACTIVATED
SLUDGE TECHNOLOGY IN THE ANAEROBIC-ANOXIC-AEROBIC”

Autori : Eugen MARIN, Carmen Otilia RUSĂNESCU, Gigel PARASCHIV, Carmen
Viviana CIUC

A fost recenzată, acceptată și este în curs de publicare la Revista Scientific Bulletin,
Series B, Chemistry and Materials Science, ISSN 1454-2331.

07.09. 2023



Alte lucrări științifice publicate

1. Gheorghescu Lavinia, I. Caraivan, Ileana Bem, Constantina Ioniță, Ana Maria Barat, **Viviana Ciucă**, Georgeta Voicu. 2000 - Comparative quantification of staphylococcal antiheamolysins from vaccinated sheep by *in vivo* and *in vitro* seroneutralisation. *Stud. Res. Vet. Med. (Bucharest)*, 2000, 8, 57-62. (ISSN 1224- 7685).
[Cuantificarea comparativă a anti-hemolizinelor stafilococice de la ovine vaccinate, prin tehnica seroneutralizării “in vivo” pe șoareci și tehnica seroneutralizării “in vitro”. *Studii Cerc. Med. Vet. (Pasteur)*, vol. 8, 165-170].
2. **Viviana Ciucă**, Lia Crețu, M. Samarineanu, 2005. Efectul mitogenic al Tiamulinului asupra limfocitelor. *Rev. Rom. Med. Vet.*, 15 (2), 113 -116 (ISSN 1221 – 5295)(CNCSIS B259)
3. **Viviana Ciucă**, Lia Crețu, M. Samarineanu, 2005. The effect of formaldehyde, used as inactivant agent, on *in vitro* swine lymphocyte mitogenesis. A note. The 4th International Symposium “Prospect for the 3rd Millennium Agriculture” Cluj-Napoca, Romania, October 6-7, 2005. *Buletinul USAMV Cluj-Napoca, Seria Med. Vet.*, vol. 62, 2005, 73-76 (ISSN 1454-2382) (CABI Publishing, CNCSIS B468)
4. **Viviana Ciucă**, Lia Crețu, M. Samarineanu, 2005. The effect of aluminum hydroxide, used as vaccine adjuvant, on *in vitro* swine lymphocyte mitogenesis. A note. The 4th International Symposium “Prospect for the 3rd Millennium Agriculture” Cluj-Napoca, Romania, October 6-7, 2005. *Buletinul USAMV Cluj-Napoca, Seria Med. Vet.*, vol. 62, 2005, 77-79 (ISSN 1454-2382) (CABI Publishing, CNCSIS B468)
5. Samarineanu M., Lia Crețu, Doina Sofei, C. Racolța, Daniela Botuș, A. Popovici, Lavinia Gheorghescu, **Viviana Ciucă**, 2005. ELISA – Kit for avian Infectious bronchitis diagnosis. The 4th International Symposium “Prospect for the 3rd Millennium Agriculture” Cluj-Napoca, Romania, October 6-7, 2005. *Buletinul USAMV Cluj-Napoca, Seria Med. Vet.*, vol. 62, 2005, 285-290 (ISSN 1454-2382) (CABI Publishing, CNCSIS B468).
6. Samarineanu M., Lia Crețu, Ana Cișmileanu, M. Gruia, L. Ciupescu, D. Militaru, Florentina Pascale, Lavinia Gheorghescu, **Viviana Ciucă**., 2005. A kit for immuno-enzymatic diagnosis of Enzootic Bovine Leukosis. The 4th International Symposium “Prospect for the 3rd Millennium Agriculture” Cluj-Napoca, Romania, October 6-7, 2005. *Buletinul USAMV Cluj-Napoca, Seria Med. Vet.*, vol. 62, 2005, p.629. *Rezumat.* (ISSN 1454-2382) (CABI Publishing, CNCSIS B468)
7. **Viviana Ciucă**, M. Samarineanu, 2006. The effect of Thiomersal on *in vitro* swine lymphocyte mitogenesis. A note. The 5th International Symposium “Prospect for the 3rd Millennium Agriculture” Cluj- Napoca, Romania, October 5-6. *Buletin USAMV Cluj-Napoca, Seria Medicină Veterinară*, vol. 63, 2006, 54-56 (ISSN 1454-2390) (CABI Publishing, CNCSIS B468)
8. **Viviana Ciucă**, Mariana Dumitrache, M. Samarineanu, 2007. Cytotoxic effect of Thiomersal on IB-RS-2 cell culture. A note. *Proceedings of the International Conference “Research people and actual tasks on multidisciplinary sciences”, First Conference, Lozenec, Bulgaria, 6-8 iunie 2007, Vol.3, 210-212.* (ISBN 978-954-91147-3-7)
9. Samarineanu M., Ana Cișmileanu, Rodica Medeanu, **Viviana Ciucă**, 2007. ELISA –Kit for diagnosis of sheep and goat paratuberculosis. Annual Scientific Session “Actualities in Animal Breeding and Pathology”, 10-11 May, USAMVB-FMV Timișoara.
Lucrari Stiințifice, Medicină Veterinară, USAMVB Timișoara, vol. XL, 595-600. (ISSN 1221 – 5295) (CNCSIS B259)
10. **Viviana Ciucă**, Samarineanu M., Mariana Dumitrache, 2007. Cytotoxic effect of THIOMERSAL on lymphocyte and IB-RS-2 cell culture. [Efect citotoxic al THIOMERSAL asupra limfocitelor și celulelor IB-RS-2 de porc, în cultură.]. Al X-lea Congres National de Medicina Veterinara, Poiana Brasov, 18 - 21 sept. 2007. *Rezumat pag.57-58.*
11. **Viviana Ciucă**, Mariana Dumitrache, 2007. The effect of phenol, used in biological products, on PK-15 cell culture. The 6th International Symposium “Prospect for the 3rd Millennium Agriculture” Cluj-Napoca, Romania, October 5-6, 2007. *Buletin USAMV Cluj-Napoca, Seria Medicină veterinară*, vol. 64, 2007(1-2)108-110 (ISSN 1454-2390) (CABI Publishing, CNCSIS B468)

12. Samarineanu M., **Viviana Ciucă**, 2007. Mitogenesis of PHA-stimulated pig lymphocytes in Phenol-added medium. The 6th International Symposium "Prospect for the 3rd Millennium Agriculture" Cluj-Napoca, Romania, October 5-6, 2007.
Buletin USAMV Cluj-Napoca, Seria Medicină veterinară, vol. 64, 2007 (1-2) 293-294 (ISSN 1454-2390) (CABI Publishing, CNCSIS B468).
13. Samarineanu M., Ana Cișmileanu, Rodica Medeanu, **Viviana Ciucă**, 2007. ELISA –Kit for diagnosis of sheep and goat paratuberculosis. Annual Scientific Session "Actualities in Animal Breeding and Pathology", 10-11 May 2007, USAMVB-FMV Timișoara.
Lucrări Științifice, Medicină Veterinară, USAMVB Timișoara, vol. XL, 595-600. (ISSN 1221 – 5295) (CNCSIS B259)
14. Samarineanu M., Daniela Botuș, Rodica Medeanu, Ana Cișmileanu, **Viviana Ciucă**, Alexandrina Alecu, 2008 - A kit for detection of anti- *M. paratuberculosis* by ELISA in serum and milk. Annual Scientific Session "Actualities in Animal Breeding and Pathology", 17-18 April 2008, USAMVB-FMV Timișoara.
15. Safta V.V., **Viviana Ciucă**, The Determination of the Optimal Chlorine Dose for the disinfection of a Microbial Contaminated Wastewater – Proceedings of the 4-th International Conference "Research People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences", Lozenec, Bulgaria, 12-16 June 2013, ISSN 1313-7735.
16. **Viviana Ciuca**, Victorita Burghilea, Daniela Nita 2013: Validation studies of microbiological method for determining the antigen concentration of Antravac vaccine, Simpozionul I. Cantacuzino „Boli prevenibile prin vaccinare”, 21-22.11.2013.
17. **Viviana Ciuca**, Victorița Burghilea, Daniela Niță, Validation studies of microbiological method for determining the antigen concentration of Ruvac vaccine, National Conference of Microbiology and Epidemiology Bucharest, noiembrie 2014.
18. **Viviana Ciucă**, Burghilea Victorița, Daneș M., Safta V.V., Niță Daniela, Raicu Adelina - Validarea metodei microbiologice de determinare a potenței reagentului de diagnostic tuberculina A - derivat purificat de mycobacterium avium - Bacteriologia- Virusologia- Parazitologia-Epidemiologia-Volumul 60 iulie-decembrie 3-4/2015, Asociația Medicală Română, Societatea Română de Microbiologie, în colaborare cu Societatea Română de Epidemiologie, București, 2015, ISSN 1220-3696.
19. **Viviana Ciucă**, Burghilea Victorița, Daneș M., Safta V.V., Cașu Olga, Niculicioiu Ramona - Mathematical modeling for determining the potency of bovine tuberculin purified protein derivative (P.P.D.) - Veterinary Drug/Medicamentul Veterinar Vol. 9 (2) 2015, Asociația Națională a Fabricanților de Produse de Uz Veterinar din România (ANFPUVR), ISSN 2069-2463.
20. **Viviana Ciucă**, Burghilea Victorița, Safta V.V., Niță Despina, Paraschiv Luciana - Mathematical modeling for benzylopenicilin potassium and streptomycin sulphate potency determination of Ascomicin - Veterinary Drug/Medicamentul Veterinar Vol. 10 (2) 2016, Asociația Națională a Fabricanților de Produse de Uz Veterinar din România (ANFPUVR), ISSN 2069-2463.
21. **Viviana Ciucă**, Burghilea Victorița, Safta V.V., Niță Despina, Paraschiv Luciana - Mathematical modeling for erytromycin potency determination of Mastiker - Veterinary Drug/Medicamentul Veterinar Vol. 10 (2) 2016, Asociația Națională a Fabricanților de Produse de Uz Veterinar din România (ANFPUVR), ISSN 2069-2463.
22. **Viviana Ciuca**, Valer Teusdea, Victorita Burghilea, V. V. Safta, Daniela Nita, Environmental impacts of veterinary antibiotics, Veterinary Drug/Medicamentul Veterinar Vol. 10 (2) 2016, Asociația Națională a Fabricanților de Produse de Uz Veterinar din România (ANFPUVR), ISSN 2069-2463.
23. **Viviana Ciuca**, Victorița Burghilea, Adelina Raicu, Olga Cașu, Ramona Niculicioiu, Microbiological monitoring of lactose used in the preparation of biological and drug products, *Lucrări științifice Medicina Veterinară*, vol XLIX, 2016 Timișoara.
24. **Viviana Ciuca**, Ramona Niculicioiu, Adelina Raicu, Monitorizarea microbiologica a mediilor cu tioglicolat și TSB folosite in controlul sterilitatii produselor biologice si medicamentoase, *Oferta cercetării științifice ASAS*, 2016.
25. **Viviana Ciuca**, V.V. Safta, Olga Casu, Modelarea matematica a concentratiei de azot proteic din concentratul de tuberculina prin metoda Kjeldahl, *Oferta cercetării științifice ASAS*, 2016.
26. **Viviana Ciucă**, Burghilea V., Safta V.V., Niță D., Paraschiv L. - Studies of Method for Determininig the Protein Concentration of "malein PPD" by Kjeldahl Method - Veterinary Drug/Medicamentul

Veterinar Vol. 11 (1) 2017, Asociația Națională a Fabricanților de Produse de Uz Veterinar din România (ANFPUVR), ISSN 2069-2463.

27. **Viviana Ciuca**, Valer Teusdea, Victorita Burghilea, V. V. Safta, Daniela Nita, Environmental Assessment for Florfenicol FP 10%, Vol 12(1)2018, Veterinary Drug/Medicamentul Veterinar, Asociația Națională a Fabricanților de Produse de Uz Veterinar din România (ANFPUVR), ISSN 2069-2463,
28. **Viviana Ciuca**, Safta V.V., Cristina R.T. - Algoritm de calcul al concentrațiilor predictibile (PEC) pentru evaluarea riscului de mediu la produse medicinale veterinare - Medicamentul Veterinar / Veterinary Drug, Vol. 12(2) Decembrie 2018, Asociația Națională a Fabricanților de Produse de Uz Veterinar din România (ANFPUVR), P-ISSN 1843 - 9527, E-ISSN 2069-2463.

Metode omologate

1. Samarineanu M, **Viviana Ciucă**, Cișmileanu Ana, , 2006. ELIPARA-OC –Trusă ELISA pentru diagnosticul paratuberculozei ovinelor și caprinelor. Înregistrata la I.C.P.B.M.V., nov.2006
2. Samarineanu M., **Viviana Ciucă**, Ana Cișmileanu, , 2007- ELISA PARA-Ruminant – Trusă pentru detecția anticorpilor ant-M. paratuberculosis la rumegătoare prin ELISA din ser și lapte. Depusă pt. Înregistrare dec. 2009

Lucrări în Proceeding-urile unor manifestări științifice

1. Safta V.V., **Viviana Ciucă**, Indoor Environmental Monitoring of Clean Rooms – International Symposium “ISB-INMA-Teh 2014” Agricultural and Mechanical Engineering, Bucharest, 30 October-1 November 2014, ISSN 2344-4118.
2. Safta V.V., **Viviana Ciucă** , The determination of the dependence between the amount of free residual chlorine and the ammonia compounds load to the disinfection of a microbial contaminated wastewater - International Symposium “ISB-INMA The 2015”, Agricultural and Mechanical Engineering, 29-31 oct. 2015, Bucharest. Print: ISSN 2344-4118. CD-ROM ISSN 2344-4126. ISSN-L 2344-4118.
3. Safta V.V., **Viviana Ciucă**, Monitorizarea microbiologică a apei de alimentare prin detecția și, numărarea Escherichia coli și a bacteriilor coliforme utilizând metoda filtrării prin membrană - International Symposium “ISB-INMA Teh”, Agricultural and Mechanical Engineering, 27-29 oct. 2016, Bucharest. Print: ISSN 2344-4118 Online: ISSN 2537-3773.