
TEZA DE DOCTORAT

Contribuții la determinarea reziduurilor de substanțe antimicrobiene din produse de origine animală prin tehnici cromatografice

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Doctorand **Vesa Gabriela Valentina**

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Marian Mihaiu**



INTRODUCERE

În contextul intensificării producției zootehnice și al globalizării lanțului alimentar, utilizarea agenților antimicrobieni în medicina veterinară a devenit indispensabilă pentru menținerea sănătății și productivității animalelor de interes economic. Totuși, administrarea frecventă a sulfonamidelor, trimetoprimului și, într-o măsură mai mică, a dapsonei poate conduce la persistența de reziduuri în carne, lapte, ouă și miere – produse destinate direct consumului uman. Aceste reziduuri reprezintă un risc semnificativ pentru sănătatea publică, determinând apariția unor reacții alergice, toxicitate cronică și, mai ales, favorizând apariției rezistenței antimicrobiene, fenomen considerat de către Organizația Mondială a Sănătății ca una dintre cele mai grave amenințări globale.

În acest cadru, teza urmărește o abordare integrată a problematicii reziduurilor de antimicrobiene în alimente, pornind de la analiza reglementărilor europene și internaționale, până la optimizarea și validarea unor metode moderne de detecție. Accentul se pune pe tehnici de cromatografie lichidă cuplată cu spectrometrie de masă în tandem (LC-MS/MS), care asigură sensibilitate, specificitate și capacitate multi-reziduu superioare metodelor clasice HPLC.

Cercetarea are patru obiective principale:

1. Analiza critică a metodelor utilizate pentru detectarea sulfonamidelor, trimetoprimului și dapsonei în produse de origine animală;
2. Dezvoltarea și validarea unei metode analitice performante, conforme cerințelor europene (Decizia 2002/657/CE) și ghidurilor internaționale de bune practici;
3. Aplicarea metodei validate pe probe reale de carne, lapte, ouă și miere, pentru evaluarea gradului de conformitate cu limitele maxime admise (MRL);
4. Interpretarea rezultatelor în contextul riscurilor pentru sănătatea publică și formularea unor recomandări pentru monitorizarea eficientă a reziduurilor.

Prin combinarea perspectivei reglementare cu progresele tehnicii analitice, teza oferă soluții practice pentru îmbunătățirea măsurilor de siguranță alimentară și pentru reducerea riscului de rezistență antimicrobiană. Rezultatele obținute contribuie atât la perfecționarea instrumentelor de control oficial, cât și la protejarea sănătății consumatorilor și a creșterii încrederii publicului în produsele de origine animală.

STRUCTURA TEZEI

Teza de doctorat intitulată " **Contribuții la determinarea reziduurilor de substanțe antimicrobiene din produse de origine animală prin tehnici cromatografice** " este alcătuită din 151 de pagini și prezintă o iconografie ce însumează un număr de 31 de figuri și 31 de tabele. Aceasta este structurată în două părți și este realizată în conformitate cu normele de redactare ale IOSUD USAMV-Cluj-Napoca.

Prima parte a tezei cuprinde 33 de pagini și este structurată în 2 capitole.

Capitolul 1, intitulat „*Introducere generală*”, conturează contextul utilizării antimicrobienele în medicina veterinară, cu accent pe sulfonamide, trimetoprim și dapsonă. Sunt prezentate rolul lor în profilaxia și tratamentul bolilor la animalele de interes zootehnic, riscurile asociate persistenței reziduurilor în alimente și impactul acestora asupra sănătății publice, în special prin favorizarea rezistenței antimicrobiene. Tot aici sunt definite scopul general și obiectivele cercetării, precum și justificarea alegerii temei în raport cu reglementările europene și internaționale privind limitele maxime de reziduuri (MRL).

Capitolul 2 – „*Stadiul actual al cunoașterii*” – reunește date detaliate despre utilizarea antimicrobienele în medicina veterinară, clasificările lor după importanța terapeutică și mecanism de acțiune, modalitățile de administrare și metabolizare la animale, precum și riscurile pentru consumatori. Sunt analizate reglementările europene și situația actuală a consumului de antimicrobiene la nivelul UE, pe baza rapoartelor EFSA, EMA și ESVAC. O parte consistentă este dedicată caracterizării farmacodinamice a sulfonamidelor, trimetoprimului și dapsonei, cu prezentarea structurii chimice, mecanismelor de acțiune, spectrului antibacterian și mecanismelor de rezistență. În final, este discutată problematica reziduurilor antimicrobiene în principalele matrice alimentare – carne, lapte, ouă și miere – și mecanismele de transfer pe lanț alimentar.

Partea a doua a tezei este structurată în 6 capitole, care includ ipoteza de lucru, obiectivele specifice, materialele și metodele utilizate, precum și prezentarea detaliată a rezultatelor experimentale. Fiecare dintre cele trei studii realizate este urmat de discuții critice, în care datele obținute sunt interpretate în raport cu literatura de specialitate și cu reglementările în vigoare. Lucrarea se încheie cu „*Concluziile generale*”, care sintetizează contribuțiile aduse în domeniul detecției și cuantificării reziduurilor antimicrobiene prin metode moderne de cromatografie lichidă cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS/MS), subliniind relevanța acestora pentru siguranța alimentară și sănătatea publică. Ultimul capitol evidențiază elementele de originalitate și contribuțiile inovative, cu accent pe validarea metodei analitice propuse și aplicabilitatea ei în programele oficiale de monitorizare a reziduurilor.

OBIECTIVELE LUCRĂRII

Scopul general al cercetării este evaluarea și optimizarea metodelor analitice pentru detecția și cuantificarea reziduurilor de sulfonamide, trimetoprim și dapsonă în produse alimentare de origine animală, cu dublu rol: asigurarea conformității cu cerințele reglementărilor europene și protejarea sănătății publice. Prin acest demers, teza urmărește întărirea capacităților de control oficial și de monitorizare, reducând riscul expunerii consumatorilor la niveluri periculoase de antimicrobiene și limitând dezvoltarea rezistenței bacteriene.

Obiectivele specifice pot fi sintetizate în cinci direcții majore:

1. **Analiza critică a literaturii** privind metodele existente de determinare a reziduurilor de antimicrobiene din carne, lapte, ouă și miere;
2. **Dezvoltarea unei metode moderne de analiză**, cu accent pe tehnica LC-MS/MS, capabilă să identifice și să cuantifice cu acuratețe compușii studiați;
3. **Validarea metodei propuse** în acord cu legislația europeană și ghidurile internaționale, prin evaluarea parametrilor de performanță esențiali: sensibilitate, specificitate, precizie, exactitate, stabilitate și robustețe;
4. **Aplicarea metodei validate pe probe reale** prelevate din lanțul de distribuție, pentru a determina nivelurile actuale de reziduuri și conformitatea cu limitele maxime admise (MRL);
5. **Interpretarea rezultatelor obținute** în raport cu riscurile pentru sănătatea publică și formularea de recomandări practice privind monitorizarea și controlul eficient al reziduurilor antimicrobiene în alimente.

Studiul 1 – Determinarea reziduurilor de sulfonamide în carne de pasăre folosind tehnica HPLC-FLD

Introducere

Creșterea intensivă a animalelor a dus la utilizarea pe scară largă a antimicrobienelelor în medicina veterinară, sulfonamidele fiind printre cele mai frecvent administrate substanțe, datorită spectrului lor larg de acțiune împotriva bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative. Totuși, persistența reziduurilor în alimente de origine animală poate genera reacții alergice și, mai ales, poate contribui la dezvoltarea

fenomenului de rezistență antimicrobiană. Monitorizarea reziduurilor de antibiotice, conform legislației europene, reprezintă o prioritate pentru siguranța alimentară și sănătatea publică.

Scopul studiului

Lucrarea a avut ca și obiectiv dezvoltarea, validarea și aplicarea unei metode selective și sensibile pentru identificarea și cuantificarea a 12 sulfonamide în carnea de pasăre, utilizând cromatografia lichidă de înaltă performanță cu detecție de fluorescență (HPLC-FLD). Studiul a urmărit evaluarea nivelului de reziduuri în probe reale și compararea rezultatelor cu limitele maxime admise (MRL) stabilite prin legislația europeană.

Materiale și metode

Au fost analizate 24 de probe de țesut muscular de pasăre, recoltate lunar, timp de un an, dintr-un areal stabilit. Metoda a implicat extracția sulfonamidelor cu acetonitril, purificarea prin cartușe SPE C18 Strata-X, derivatizarea precoloană cu fluorescamină și analiza prin HPLC-FLD. Validarea metodei s-a realizat conform Deciziei Comisiei 2002/657/CE, prin determinarea parametrilor de performanță: linearitate, selectivitate, specificitate, sensibilitate, limite de detecție și cuantificare, precizie, reproducibilitate, robustețe și incertitudine de măsurare.

Rezultate și discuții

Metoda dezvoltată a demonstrat recuperări cuprinse între 87–118%, o bună repetabilitate (RSDr <6%) și reproductibilitate (RSDR <15%), precum și limite de detecție situate între 3,3–5,2 μg/kg, valori încadrate în cerințele legislative. În urma aplicării pe probe reale, reziduuri de sulfaquinoxalină au fost detectate în două probe (8,33% din total), la niveluri de 31,98 μg/kg și 23,70 μg/kg, sub limita maximă admisă de 100 μg/kg. Concentrațiile pozitive au provenit din același lot, sugerând o posibilă nerespectare a perioadei de așteptare post-tratament. Rezultatele confirmă relevanța metodei pentru monitorizarea reziduurilor și pentru prevenirea riscurilor asociate expunerii consumatorilor.

Concluzii

Studiul demonstrează pentru prima dată în România aplicabilitatea unei metode HPLC-FLD pentru detecția și cuantificarea simultană a 12 sulfonamide în carnea de pasăre. Metoda validată respectă standardele europene și poate fi utilizată în programele de control oficial. Rezultatele obținute subliniază importanța monitorizării continue a reziduurilor de antimicrobiene, atât pentru siguranța alimentară, cât și pentru reducerea riscului de rezistență bacteriană.

Studiul 2 – Dezvoltarea și validarea unei metode LC-MS/MS pentru detecția simultană a sulfonamidelor, trimetoprimului și dapsonei în miere

Introducere

Mierea, apreciată pentru valoarea sa nutritivă și terapeutică, este totodată vulnerabilă la contaminarea cu reziduuri de antimicrobiene utilizate în apicultură pentru tratarea bolilor bacteriene și parazitare. Sulfonamidele, trimetoprimul și dapsona sunt compuși de interes major, datorită utilizării lor frecvente și a riscurilor asociate prezenței reziduurilor: inducerea rezistenței bacteriene, reacții alergice și posibile efecte genotoxice. În Uniunea Europeană, legislația interzice sulfonamidele și dapsona în miere, aplicând o politică de toleranță zero, ceea ce face necesară dezvoltarea unor metode analitice extrem de sensibile și specifice.

Scopul studiului

Lucrarea a urmărit dezvoltarea și validarea unei metode robuste de cromatografie lichidă de ultra-înaltă performanță cu spectrometrie de masă în tandem (UHPLC-MS/MS) pentru detecția simultană a 22 de sulfonamide, a trimetoprimului și a dapsonei în probe de miere. Obiectivul principal a fost furnizarea unui instrument analitic de înaltă precizie, aplicabil în programele oficiale de monitorizare a reziduurilor de medicamente veterinare din România.

Materiale și metode

Metoda a presupus: **pregătirea probelor** prin hidroliză acidă și extracție în fază solidă (SPE) pentru a separa antimicrobienele de matricea complexă a mierii; **analiza cromatografică** realizată pe o coloană C18 submicronică, cu detecție prin spectrometrie de masă triplu cvadrupol în modul ESI pozitiv; **calibrare** pe matrice polifloră, la concentrații între 5–150 µg/kg pentru sulfonamide și trimetoprim și 0,5–15 µg/kg pentru dapsonă și **validare** conform Deciziei CE 2002/657 și ghidurilor SANCO, prin testarea parametrilor de performanță: liniaritate, sensibilitate, specificitate, recuperare, precizie (RSDr, RSDR), limite de detecție și de cuantificare, CCα, CCβ, stabilitate și incertitudine de măsurare.

Rezultate și discuții

Metoda dezvoltată a demonstrat o **excelentă sensibilitate**, cu limite de detecție sub valorile minime de performanță recomandate (LOD <1 µg/kg pentru majoritatea sulfonamidelor și trimetoprim, respectiv <0,5 µg/kg pentru dapsonă). Recuperările s-au situat între 80–120%, iar coeficienții de corelație au depășit 0,99. Precizia, atât ca repetabilitate, cât și ca reproductibilitate, a fost în limitele cerute (RSD <20%). În probele reale de miere analizate, nu au fost identificate reziduuri peste limitele de decizie (CCα), confirmând eficiența metodei în detectarea compușilor interziși la niveluri foarte reduse.

Concluzii

Acest studiu raportează pentru prima dată în România dezvoltarea și validarea unei metode UHPLC-MS/MS pentru detecția simultană a sulfonamidelor, trimetoprimului și dapsonei în miere. Metoda respectă cerințele europene, este aplicabilă în laboratoarele oficiale și reprezintă un instrument strategic pentru monitorizarea siguranței produselor apicole. Prin sensibilitatea și specificitatea ridicată, metoda contribuie la implementarea politicii europene de toleranță zero privind reziduurile antimicrobiene în miere, asigurând protecția sănătății publice și creșterea încrederii consumatorilor în produsele apicole autohtone.

Studiul 3. identificarea și cuantificarea reziduurilor de sulfonamide trimetoprim și dapsonă în ouă de consum

Introducere

Sulfonamidele reprezintă, după tetraciclina, una dintre cele mai utilizate clase de antibiotice veterinare în Uniunea Europeană, datorită spectrului larg de acțiune și costului redus. Administrarea lor, precum și a compuşilor adjuvanți precum trimetoprimul și dapsona, poate conduce la persistența reziduurilor în alimente, inclusiv în ouă, cu posibile efecte adverse asupra sănătății consumatorilor: reacții alergice, toxicitate cronică și favorizarea rezistenței antimicrobiene. În timp ce pentru țesuturile animale există limite maxime admise (MRL) stabilite prin reglementările europene, pentru ouă nu au fost definite MRL-uri, ceea ce impune o politică de toleranță zero. Această situație reclamă metode analitice extrem de sensibile și selective, capabile să detecteze și să cuantifice niveluri foarte scăzute de reziduuri.

Scopul studiului

Studiul a urmărit dezvoltarea, optimizarea și validarea unei metode de cromatografie lichidă de ultra-înaltă performanță cu spectrometrie de masă în tandem (UHPLC-MS/MS) pentru identificarea și cuantificarea simultană a 22 de sulfonamide, a trimetoprimului și a dapsonului în ouă de consum.

Materiale și metode

Au fost analizate 20 de probe de ouă provenite din ferme convenționale și ecologice din județul Cluj. Probele au fost omogenizate, supuse unei extracții succesive cu acetonitril, degresate cu hexan și purificate prin cartușe SPE Strata-X. Analiza cromatografică a fost realizată pe o coloană Pursuit XRs Ultra C18, cu fază mobilă binară acidificată, în regim de gradient. Detecția s-a efectuat prin LC-MS/MS în modul electrospray pozitiv, monitorizând tranziții multiple de reacție specifice pentru fiecare analit. Validarea a fost realizată conform Deciziei CE 2002/657/CE și ghidurilor SANCO, testând parametri precum linearitate, selectivitate, specificitate, sensibilitate, precizie, recuperare, limite de decizie ($CC\alpha$), capacitate de detecție ($CC\beta$), robustețe și incertitudine de măsurare.

Rezultate și discuții

Metoda dezvoltată a demonstrat o **sensibilitate excelentă**, cu limite de detecție sub 1 $\mu\text{g/kg}$ pentru majoritatea sulfonamidelor și trimetoprim și sub 0,5 $\mu\text{g/kg}$ pentru dapsonă. Recuperările s-au încadrat între 80–120%, iar coeficienții de corelație ai curbelor de calibrare au depășit 0,99. Precizia metodei a fost confirmată prin valori ale repetabilității și reproductibilității sub 20% pentru toți analiții. Analiza probelor reale nu a evidențiat depășiri ale limitelor de decizie, confirmând conformitatea probelor testate. Totuși, prezența unor urme sub limitele de cuantificare demonstrează utilitatea metodei pentru detectarea precoce a contaminărilor.

Concluzii

Studiul validează pentru prima dată în România aplicarea unei metode UHPLC-MS/MS pentru detecția simultană a unui spectru larg de sulfonamide, alături de trimetoprim și dapsonă, în ouă de consum. Metoda respectă standardele europene, prezintă o sensibilitate ridicată și o precizie robustă, fiind adecvată pentru programele de monitorizare oficială. Implementarea acestei tehnici contribuie la garantarea siguranței alimentare și la reducerea riscului de expunere a consumatorilor la reziduuri de antimicrobiene, sprijinind totodată strategia europeană de combatere a rezistenței bacteriene.

CONCLUZII GENERALE

Teza de doctorat a avut ca și scop dezvoltarea, validarea și aplicarea unor metode moderne pentru detecția și cuantificarea reziduurilor de antimicrobiene în produse alimentare de origine animală, vizând trei matrici cu relevanță majoră: **carnea de pasăre, mierea și ouăle de consum**.

Rezultatele obținute demonstrează că metodele propuse – HPLC-FLD pentru carne de pasăre și LC-MS/MS pentru miere și ouă – respectă cerințele europene și internaționale privind validarea, fiind caracterizate prin **specificitate ridicată, sensibilitate excelentă, recuperări corespunzătoare și reproductibilitate solidă**. Aplicarea pe probe reale a confirmat atât robustețea metodelor, cât și relevanța lor practică pentru monitorizarea siguranței alimentare. Detectarea reziduurilor de sulfaquinoxalină în două probe de carne de pasăre, la niveluri sub MRL, ilustrează importanța respectării perioadei de așteptare post-tratament. În cazul mierii, metoda validată a trecut cu succes o testare internațională (Fapas), confirmând aplicabilitatea în

rețeaua globală de monitorizare. Pentru ouă, metoda dezvoltată s-a dovedit extrem de sensibilă și robustă, cu posibilitate de extindere la alte produse complexe.

Lucrarea subliniază necesitatea consolidării planurilor naționale de control, perfecționării cadrului legislativ (în special pentru miere și ouă, unde lipsesc MRL-uri clar definite) și implementării unei abordări **One Health**, care să coreleze sănătatea animalelor, siguranța alimentelor și sănătatea publică.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Originalitatea tezei constă în integrarea unor **metode moderne, fiabile și aplicabile imediat** în controlul sanitar-veterinar și în monitorizarea reziduurilor. Contribuțiile majore includ:

- primul studiu în România privind dezvoltarea unei metode multireziduale HPLC-FLD pentru carne de pasăre;
- validarea și aplicarea unei metode LC-MS/MS pentru miere, confirmată prin scheme internaționale de competență;
- extinderea metodei LC-MS/MS la ouă de consum, o matrice complexă și puțin abordată la nivel național;
- crearea unei platforme metodologice unitare, adaptabile pentru diferite produse alimentare;
- furnizarea de date primare privind contaminarea alimentelor cu antimicrobiene în România;
- sprijinirea autorităților de control și a laboratoarelor oficiale prin instrumente de analiză cu valoare aplicativă imediată.

În ansamblu, cercetarea aduce o contribuție științifică și practică semnificativă la domeniul siguranței alimentare, prin validarea unor metode performante, comparabile cu cele utilizate la nivel internațional, și prin promovarea unei abordări integrate menite să protejeze sănătatea publică și să limiteze impactul rezistenței antimicrobiene.