



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
BABEȘ-BOLYAI TUDOMÁNYEGYETEM
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITÄT
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITY
TRADITIO ET EXCELLENTIA



FACULTATEA DE ȘTIINȚA
ȘI INGINERIA MEDIULUI

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE ȘTIINȚA ȘI INGINERIA MEDIULUI
ȘCOALA DOCTORALĂ ȘTIINȚA MEDIULUI

**Studii privind consumul de produse farmaceutice
în rândul populației utilizând ca biomarkeri
reziduurile din ape uzate**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Doctorand:

HERGHELEGIU (căs. POPOVICI) Mihaela-Cătălina

Conducător de doctorat:

Conf. dr. habil. BELDEAN-GALEA Mihail Simion

CLUJ-NAPOCA

2025

Mulțumiri

Deosebită recunoștință și alese mulțumiri aduc domnului conferențiar dr. habilitat Mihail Simion Beldean-Galea, conducătorul științific al tezei de doctorat, pentru permanenta sa îndrumare științifică, răbdarea și profesionalismul de care a dat dovadă pe parcursul stagiului doctoral, având astfel o contribuție semnificativă la formarea mea profesională.

Mulțumiri și profund respect prezint doamnei dr. Maria-Virginia Coman, cercetător științific gradul I, pentru contribuția adusă la formarea mea profesională, prin îndrumarea, ajutorul, sfaturile și răbdarea oferite pe parcursul stagiului doctoral.

De asemenea, mulțumesc doamnelor profesor dr. Valérie Pichon și conferențiar dr. Audrey Combès pentru sprijinul logistic acordat pe parcursul stagiului de cercetare desfășurat la École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de Paris (ESPCI Paris-PSL), Paris, Franța, precum și domnului lector dr. Róbert Tötös de la Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeș-Bolyai.

Mulțumiri tuturor membrilor comisiei de îndrumare care au acceptat să evalueze manuscrisul tezei de doctorat și să participe la susținerea publică a acesteia, precum și pentru sfaturile și sugestiile oferite.

Doresc să-mi exprim recunoștința față de colectivul Laboratorului de Cercetare-Producție Chimie Analitică din cadrul Institutului de Cercetări în Chimie „Raluca Ripan”, Universitatea Babeș-Bolyai, cu care am colaborat pe parcursul stagiului doctoral și să mulțumesc atât pentru discuțiile științifice constructive cât și pentru sprijinul logistic oferit.

Le mulțumesc sincer tuturor colegilor care mi-au fost alături în această perioadă, și cu care am împărtășit momentele frumoase și dificile ale acestor ani.

În mod deosebit, vreau să mulțumesc familiei mele pentru dragostea necondiționată, sprijinul moral și financiar, înțelegerea și răbdarea de care au dat dovadă pe tot parcursul stagiului doctoral. Și nu în ultimul rând, mulțumesc soțului meu, Ștefan, care m-a susținut, încurajat și mi-a fost mereu alături.

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	1
PARTEA I – CONSIDERAȚII TEORETICE	4
1. MEDICAMENTELE STUDIATE	4
1.1. Generalități despre medicamentele studiate	4
1.2. Paracetamol și antiinflamatoare nesteroidiene. Definiție, clasificare, reprezentanți	5
1.3. Hormoni steroidieni. Definiție, clasificare, reprezentanți	7
1.4. Medicamente beta-blocante. Definiție, clasificare, reprezentanți	9
2. MEDICAMENTELE ȘI MEDIUL ÎNCONJURĂTOR	11
2.1. Medicamentele – Surse de poluare	11
2.2. Efectele medicamentelor asupra mediului înconjurător	14
2.3. Norme legislative privind poluarea cu medicamente	17
3. EPIDEMIOLOGIA BAZATĂ PE APE UZATE	18
3.1. Generalități, metodologie, terminologie	18
3.2. Cerințe privind prelevarea probelor de apă uzată	21
3.3. Biomarkeri utilizați în epidemiologia bazată pe ape uzate	24
3.4. Estimarea numărului de locuitori conectați la sistemul de canalizare	28
3.5. Estimarea consumului de medicamente și a încărcării cu reziduuri de medicamente a apelor uzate	31
3.6. Cerințe de prelucrare a probelor prelevate și de analiză a medicamentelor studiate necesare în epidemiologia bazată pe ape uzate	34
3.6.1. <i>Metode de extracție</i>	34
3.6.2. <i>Tehnici cromatografice de analiză</i>	42
3.6.3. <i>Validarea metodelor de analiză</i>	51
PARTEA a II-a – CONTRIBUȚII ORIGINALE	58
Determinarea consumului unor medicamente în rândul populației din Cluj-Napoca prin metoda epidemiologiei bazate pe ape uzate	58
4. STUDIUL DE CAZ Nr. 1. – Paracetamol și antiinflamatoare nesteroidiene. Determinarea consumului în rândul populației din Cluj-Napoca	60
4.1. Optimizarea metodelor cromatografice de analiză	61
4.1.1. <i>Analiza paracetamolului și a antiinflamatoarelor nesteroidiene studiate prin cromatografia în fază lichidă cuplată cu detector cu fotodiode (HPLC-PDA)</i>	61

4.1.2.	<i>Analiza paracetamolului și a antiinflamatoarelor nesteroidiene studiate prin cromatografia în fază gazoasă cuplată cu spectrometria de masă cu mod SIM (GC-MS-SIM)</i>	65
4.1.3.	<i>Analiza paracetamolului și a antiinflamatoarelor nesteroidiene studiate prin cromatografia în fază lichidă cuplată cu spectrometria de masă în tandem (LC-MS/MS)</i>	76
4.2.	Optimizarea metodelor de extracție a paracetamolului și a antiinflamatoarelor nesteroidiene studiate din ape uzate	85
4.2.1.	<i>Extracția lichid-lichid</i>	85
4.2.2.	<i>Extracția pe fază solidă</i>	88
4.3.	Analiza reziduurilor de paracetamol și de antiinflamatoare nesteroidiene studiate din probele de apă uzată prelevate	93
4.3.1.	<i>Analiza HPLC-PDA a reziduurilor de paracetamol și de antiinflamatoare nesteroidiene studiate din probele de apă uzată prelevate</i>	93
4.3.2.	<i>Analiza GC-MS-SIM a reziduurilor de paracetamol și de antiinflamatoare nesteroidiene studiate din probele de apă uzată prelevate</i>	94
4.3.3.	<i>Analiza LC-MS/MS a reziduurilor de paracetamol și de antiinflamatoare nesteroidiene studiate din probele de apă uzată prelevate pentru estimarea consumului de medicamente</i>	97
4.4.	Estimarea consumului de paracetamol și de antiinflamatoare nesteroidiene studiate în rândul populației din Cluj-Napoca pe baza apelor uzate	100
4.4.1.	<i>Încărcarea apelor uzate cu paracetamol și antiinflamatoarele nesteroidiene studiate</i>	101
4.4.2.	<i>Estimarea numărului de locuitori din Cluj-Napoca conectați la sistemul de canalizare</i>	102
4.4.3.	<i>Estimarea consumului de paracetamol și de antiinflamatoare nesteroidiene studiate utilizând epidemiologia bazată pe ape uzate</i>	105
5.	STUDIUL DE CAZ Nr. 2. – Hormoni steroidieni.	
	Determinarea încărcării normalizate în rândul populației din Cluj-Napoca ..	114
5.1.	Analiza hormonilor steroidieni studiați prin cromatografia în fază lichidă cuplată cu detector cu fotodiode (HPLC-PDA)	115
5.2.	Optimizarea metodei de extracție pe fază solidă a hormonilor steroidieni studiați din ape uzate	118
5.3.	Analiza HPLC-PDA a reziduurilor de hormoni steroidieni studiați din probele de apă uzată prelevate	121
5.4.	Estimarea încărcării cu hormoni steroidieni studiați a apelor uzate din Cluj-Napoca	125

5.4.1.	<i>Estimarea numărului de locuitori din Cluj-Napoca conectați la sistemul de canalizare</i>	126
5.4.2.	<i>Estimarea încărcării normalizate a apelor uzate cu hormoni steroidieni studiați</i>	126
6.	STUDIUL DE CAZ Nr. 3. – beta-Blocante.	
	Determinarea consumului în rândul populației din Cluj-Napoca	131
6.1.	Optimizarea metodelor cromatografice de analiză	132
6.1.1.	<i>Analiza beta-blocantelor studiate prin cromatografia în fază lichidă cuplată cu detector cu fotodiode (HPLC-PDA)</i>	132
6.1.2.	<i>Analiza beta-blocantelor studiate prin cromatografia în fază gazoasă cuplată cu spectrometria de masă cu mod SIM (GC-MS-SIM)</i>	136
6.1.3.	<i>Analiza beta-blocantelor studiate prin cromatografia în fază lichidă cuplată cu spectrometria de masă în tandem (LC-MS/MS)</i>	143
6.2.	Optimizarea metodelor de extracție a beta-blocantelor studiate din ape uzate	149
6.2.1.	<i>Extracția pe fază solidă</i>	149
6.2.2.	<i>Microextracția dispersivă lichid-lichid</i>	151
6.3.	Analiza LC-MS/MS a reziduurilor de beta-blocante studiate din probele de apă uzată prelevate pentru estimarea consumului de medicamente	172
6.4.	Estimarea consumului de beta-blocante studiate în rândul populației din Cluj-Napoca pe baza apelor uzate	175
6.4.1.	<i>Încărcarea apelor uzate cu medicamentele beta-blocante studiate</i>	175
6.4.2.	<i>Estimarea numărului de locuitori din Cluj-Napoca conectați la sistemul de canalizare</i>	176
6.4.3.	<i>Estimarea consumului de beta-blocante studiate utilizând epidemiologia bazată pe ape uzate</i>	179
	CONCLUZII FINALE	187
	REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	192
	ANEXE	215
	Anexa I. Lista abrevierilor utilizate frecvent în teza de doctorat	4p
	Anexa II. Lista publicațiilor științifice și a lucrărilor comunicate la manifestări științifice pe baza cercetărilor realizate în cadrul studiului doctoral	2p
	Anexa III. Stagii de cercetare desfășurate în străinătate în cadrul programului doctoral	1p

INTRODUCERE

Numeroase studii din literatură (Kummerer, 2009; Yi et al., 2020; Rastogi et al., 2021; Adeleye et al., 2022; Kock et al., 2023; Choi et al., 2024) atrag atenția asupra reziduurilor de produse farmaceutice prezente în mediile acvatice ale țărilor industrializate și în ale celor în curs de dezvoltare, deoarece acestea constituie un risc asupra mediului și a sănătății publice. Reziduurile provin în mare parte în urma consumului sau producției de medicamente. Consumul de medicamente reflectă condițiile socio-economice ale țării, precum și starea de sănătate a populației. Apariția afecțiunilor sezoniere (răceli, viroze, gripe, alergii) sau a unei pandemii (SARS-CoV-2) conduc la creșterea consumului unor clase de medicamente (Samal et al., 2022).

Colectarea tradițională a informațiilor referitoare la consumul de medicamente în rândul populației se realizează prin centralizarea prescripțiilor medicale, a datelor privind vânzările de medicamente deținute de farmacii, companii sau prin intermediul chestionarelor, dar toate aceste metode prezintă limitări (Castiglioni et al., 2014; Escola Casas et al., 2021).

O nouă metodă de monitorizare a consumului de substanțe, numită „Epidemiologia bazată pe ape uzate” (wastewater based epidemiology, WBE) a fost dezvoltată în ultimii 20 de ani (Zuccato et al., 2005; Castiglioni et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2017; Kasprzyk-Hordern et al., 2023). Încă de la prima aplicare în anul 2005 de către Zuccato, metoda WBE a cunoscut o dezvoltare spectaculoasă. Metoda se bazează pe măsurarea biomarkerilor (produsi de metabolism uman) și/sau a compușilor părinți, excretați de către populație, în sistemul de canalizare, iar informațiile oferite sunt calitative, cantitative, aproape în timp-real și oferă anonimitatea persoanei care a consumat.

În România, datele aferente consumului de medicamente în rândul populației sunt greu de accesat, iar studiile cu privire la acest consum pe baza epidemiologiei bazate pe ape uzate sunt foarte puține și sunt realizate în cadrul unor studii europene (Castiglioni et al., 2021; EUDA, 2024.). Aceste studii urmăresc, în principal, consumul de substanțe ilicite. Ca urmare, teza prezintă elaborarea unor metode de analiză și extracție a paracetamolului împreună cu patru antiinflamatoare nesteroidiene (ketoprofen, naproxen, diclofenac și ibuprofen), a cinci hormoni steroidieni (estriol, 17- β -estradiol, estronă, 17- α -etinilestradiol și hidroclotizon), precum și a opt medicamente beta-blocante (atenolol, nadolol, pindolol, acebutolol, metoprolol, bisoprolol, propranolol și betaxolol) din probe de apă uzată și aplicarea metodei epidemiologiei bazate pe ape uzate pentru a estima consumul acestora în rândul populației.

Cercetările realizate în prezenta teză de doctorat privesc medicamentele menționate și se concentrează pe următoarele aspecte:

- ✓ Dezvoltarea unor metode de analiză a medicamentelor studiate prin cromatografia de înaltă performanță în fază lichidă cu detecție cu fotodiode, precum și cuantificarea acestor compuși în probe de apă uzată.
- ✓ Dezvoltarea unor metode de analiză a unor medicamente studiate (paracetamol, antiinflamatoare nesteroidiene, beta-blocante) prin cromatografia în fază gazoasă cuplată cu spectrometrie de masă, precum și cuantificarea acestora în probe de apă uzată.
- ✓ Dezvoltarea unor metode de analiză a unor medicamentelor studiate (paracetamol, antiinflamatoare nesteroidiene, beta-blocante) prin cromatografia de înaltă performanță în fază lichidă cuplată cu spectrometria de masă în tandem, precum și cuantificarea acestora în probe de apă uzată.
- ✓ Dezvoltarea unor metode de extracție a medicamentelor studiate din apă uzată, utilizând extracția lichid-lichid (paracetamol și antiinflamatoare nesteroidiene), extracția pe fază solidă (paracetamol, antiinflamatoare nesteroidiene, hormoni steroidieni, beta-blocante) și microextracția dispersivă lichid-lichid (beta-blocante).
- ✓ Estimarea consumului de medicamente studiate prin aplicarea epidemiologiei bazate pe ape uzate, utilizând concentrațiile determinate în probele de apă colectate din influentul stației de epurare a municipiului Cluj-Napoca.

Noutatea acestei teze constă în faptul că metoda epidemiologiei bazate pe ape uzate utilizată pentru estimarea consumului medicamentelor menționate în rândul populației, în România, este la prima încercare, iar extracția simultană a opt beta-blocante cu ajutorul microextracției dispersive lichid-lichid, după știința noastră, nu este menționată în datele din literatură.

Prezenta teză de doctorat este structurată în două părți, o parte teoretică care cuprinde studiul de literatură în specificul tezei și o parte experimentală care prezintă contribuțiile originale.

Partea teoretică este structurată în trei capitole care cuprind: (i) date generale despre medicamentele studiate, (ii) informații despre efectele acestora asupra mediului înconjurător ca surse poluante și normele legislative în vigoare, (iii) descrierea metodei epidemiologiei bazate pe ape uzate, precum și pașii de urmat, necesari aplicării acesteia.

Partea experimentală este structurată tot în trei capitole, în care sunt prezentate contribuțiile originale privind medicamentele studiate: (i) metodele de analiză prin diferite tehnici cromatografice, (ii) metodele de extracție și microextracție și (iii) estimarea consumului de medicamente în rândul populației aflată sub investigație.

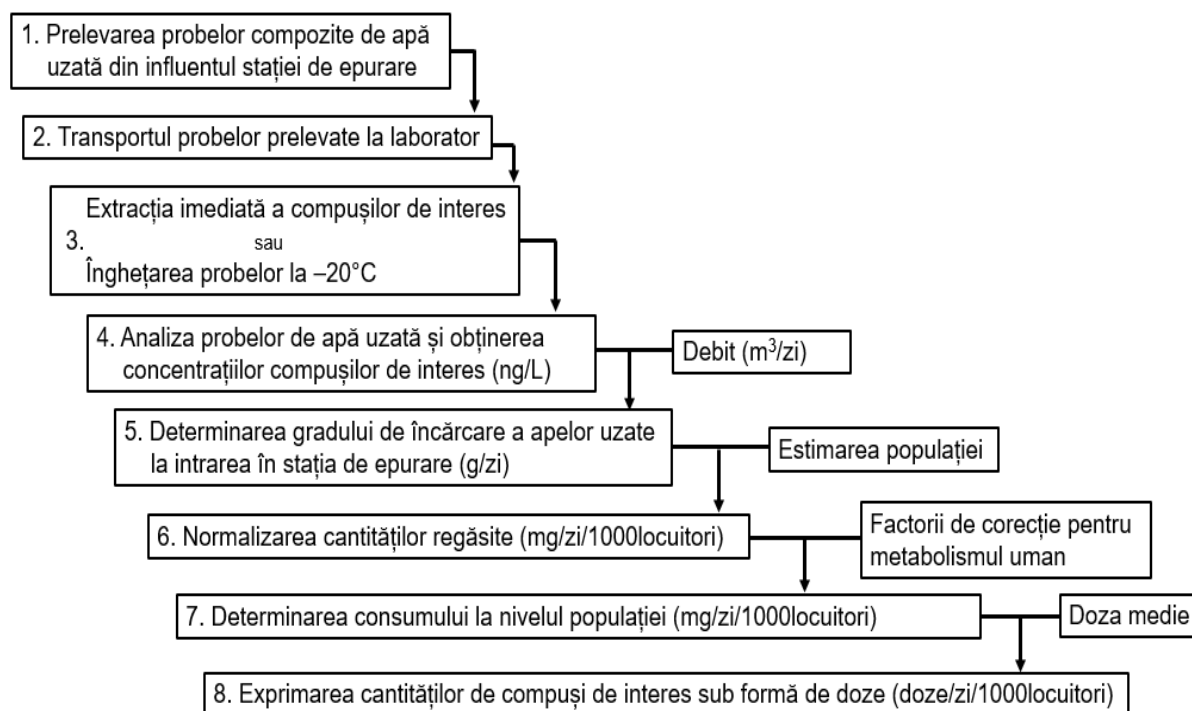
Rezultatele prezentate în lucrarea de față au fost realizate în cadrul studiului doctoral și au fost diseminate în cadrul unor manifestări științifice internaționale, în țară și străinătate, publicate sau sunt în curs de publicare în reviste cotate ISI.

La sfârșitul prezentei teze de doctorat sunt anexate:

- ✓ Lista abrevierilor utilizate frecvent în teza de doctorat (Anexa I),
- ✓ Lista publicațiilor științifice și participările la manifestări științifice (Anexa II) și
- ✓ Nota privind stagiul de cercetare desfășurat în străinătate (Anexa III).

Epidemiologia bazată pe ape uzate (*Wastewater Based Epidemiology, WBE*) este o metodă relativ nouă și bine definită (Reinstadler et al., 2021) care se bazează pe analiza unui **biomarker** (produs de excreție al metabolismului uman) și/sau a **compusului părinte** prezent în apele uzate neepurate, în vederea obținerii informațiilor calitative și cantitative privind activitățile umane dintr-o anumită zonă, conectate la același **sistem de canalizare** (Zucatto et al., 2005; van Nuijs et al., 2011; Castiglioni et al., 2013; Gracia-Lor et al., 2017). Totodată, WBE este o metodă complementară în studiile care urmăresc consumul compușilor de interes în rândul populației, deoarece aduce informații suplimentare despre consumul de scurtă și de lungă durată sau despre cel ocazional (evenimente sportive sau muzicale) al acestor compuși, fapt ce permite monitorizarea și avertizarea cu privire la consumul de substanțe psihoactive noi sau etnobotanice, și acoperă aproape întreaga populație conectată la sistemul de canalizare (Castiglioni et al., 2014; Lai et al., 2016). Mai mult, o analiză detaliată a datelor obținute cu această metodă coroborate cu cele din diferite seturi de date rezultate din campanii de informare, strategii de diminuare a consumului, prezența unor virusuri etc. poate fi deosebit de utilă prin noile informații aduse (Boogaerts et al., 2021).

Totuși, metoda WBE prezintă și câteva dezavantaje generate de lipsa informațiilor în legătură cu puritatea, dozajul sau cu frecvența de utilizare a compusului de interes și, în unele cazuri, modul de administrare, un singur compus sau concomitent cu alți compuși. Ca urmare, metoda nu redă clar numărul consumatorilor deoarece cantitatea consumată este normalizată (mg/zi/1000locuitori sau doze/zi/1000locuitori), nu face distincția între un consum ridicat datorat creșterii numărului de consumatori sau creșterii dozei consumate și nici nu poate estima prețul compusului de interes (Castiglioni et al., 2014; Rice et al., 2020; Boogaerts et al., 2021).



Succesiunea etapelor și datele necesare pentru determinarea consumului compușilor de interes prin intermediul metodei epidemiologiei bazate pe ape uzate.

Importanța studiului WBE

Medicamentele sunt compuși chimici terapeutici, creați special sau izolați, pentru a preveni, ameliora sau trata diferite boli. Conțin substanțe farmaceutice active, individuale sau în combinații, având capacitatea de a traversa membranele celulare și a produce efectul terapeutic dorit (Calisto & Esteves, 2009). Consumul tot mai ridicat de medicamente este cauzat de mai mulți factori: (i) creșterea nivelului de trai și cererea tot mai mare de produse alimentare, în special proteină animală (Kock et al., 2023), (ii) îmbătrânirea demografică a populației și vulnerabilitatea față de afecțiunile cronice, (iii) creșterea numărului de medicamente disponibile pentru tratamentul diferitelor afecțiuni și boli, (iv) accesul ușor la medicamente, precum și (v) influența industriei farmaceutice prin reclamele promovate intensiv (Escola Casas et al., 2021).

Medicamentele prezintă diferite structuri chimice, dar clasificarea uzuală se face pe clase sau grupe terapeutice bazate pe modul de acțiune și tratamentul bolilor, cum ar fi: antibiotice, analgezice și antiinflamatoare, hormonale, antidepresive, antivirale, anticoagulante, sedative etc. (Samal et al., 2022).

Medicamentele sunt, în general, compuși polari, cu structuri chimice variate, prezentând una sau mai multe grupări ionizabile, proprietăți lipofile sau hidrofile (Patel et al., 2019), caracter acid, bazic sau amfoter. Orice modificare în structura chimică a unui medicament poate avea consecințe asupra solubilității și a polarității acestuia, dar și asupra unor proprietăți privind comportamentul lor în mediu, unde medicamentele se regăsesc sub diferite forme (neutre, cationice, anionice sau zwitterionice), generând astfel un comportament complex. Medicamentele își păstrează structura chimică mult timp după utilizare, pentru a-și putea îndeplini rolul, prin urmare un procent destul de ridicat este eliberat în factorii de mediu, în forma originală (Feng et al., 2013).

Progresul și creșterea numărului de medicamente disponibile pentru tratamentul afecțiunilor și al bolilor se poate observa prin concentrațiile tot mai mari regăsite în mediul înconjurător, în special în mediul acvatic (Rastogi et al., 2021).

Medicamentele și metaboliții acestora ajung în factorii de mediu, în special în apă, în urma evacuării apelor epurate din stațiile de epurare, acesta fiind punctul de transfer în factorii de mediu (Khumalo et al., 2023). Stațiile de epurare primesc ape uzate domestice, spitalicești, industriale, precum și cele provenite de la fermele de animale. În majoritatea cazurilor, stațiile de epurare sunt construite să elimine nutrienții, patogenii, particulele materiale, dar nu și compușii farmaceutici (Adeleye et al., 2022; KołECKA et al., 2022). Medicamentele pot să ajungă în apă și sol în urma utilizării nămolului de la stațiile de epurare ca îngrășământ sau a gunoierului de la fermele de animale, precum și din locurile gestionate necorespunzător unde au fost îngropate cadavre de animale (Nguyen et al., 2023).

În apele uzate domestice, sursele de medicamente, atât în mediul urban cât și rural, sunt consumul, spălarea acestora de pe corp sau aruncarea la canalizare a medicamentelor expirate, nedorite sau neutilizate. În Uniunea Europeană, medicamentele expirate au un sistem special de colectare, de altfel și în România. După expirarea termenului de valabilitate, medicamentele trebuie duse la centrele speciale de colectare din cadrul spitalelor, la punctele care se ocupă de gestionarea acestora sau la farmacii (Tit et al., 2016; Bungau et al., 2018).

Medicamentele sunt special concepute pentru a provoca un răspuns biologic în urma utilizării, dar pot produce și un efect nespecific, datorită persistenței și rezistenței la degradare (González-González et al., 2022). Eliberarea constantă a acestora în factorii de mediu produce efecte mutagene, genotoxice și ecotoxicologice asupra plantelor, animalelor și oamenilor (Samal et al., 2022; Huynh et al., 2023).

Monitorizarea încărcării apei uzate cu medicamente și a consumului acestora prezintă importanță deosebită, întrucât furnizează dovezi și informează factorii decizionali în legătură

cu sănătatea populației și a mediului. Pentru a obține date cantitative, sunt utilizate ecuații matematice și se ia în considerare biomarkerul sau compusul părinte măsurat în influența stației de epurare împreună cu informațiile legate de metabolismul uman, respectiv ratele de excreție a medicamentelor, debitul apei uzate la intrarea în stația de epurare, precum și numărul locuitorilor conectați la sistemul de canalizare (Zuccato et al., 2005; van Nuijs et al., 2011; Lai et al., 2011; Han et al., 2022).

Modul de metabolizare și rata de excreție sunt specifice fiecărui medicament și variază în funcție de starea de sănătate, stilul de viață, vârstă și sex (Holton et al., 2022). La estimarea consumului de medicamente trebuie să se țină cont atât de administrarea parenterală și cât și de cea topică (Kannan et al., 2023).

Epidemiologia bazată pe ape uzate oferă posibilitatea de estimare a consumului de medicamente în vederea evaluării impactului acestora asupra mediului (Ceolotto et al., 2024).

Cerințe de prelucrare a probelor prelevate și de analiză a medicamentelor studiate necesare în epidemiologia bazată pe ape uzate

Metode de extracție

Deși sunt progrese tehnologice din domeniul chimiei analitice, totuși majoritatea instrumentelor nu sunt capabile să analizeze direct probele complexe, în special probele cu concentrații ale compușilor la nivel de ultraurme. Etapa de pregătire a probei pentru analiza propriu-zisă presupune izolarea și/sau preconcentrarea compușilor de interes din diferite matrici, precum și transpunerea compușilor de interes într-o formă compatibilă cu sistemul analitic, în vederea realizării separării, respectiv a detecției acestora. Este etapa care necesită în jur de 80% din timpul necesar finalizării unei analize și are importanță deosebită în rezultatul final deoarece este sursa generatoare de cele mai multe erori, cu efecte asupra tuturor etapelor ulterioare (Robards et al., 2004; Chen et al., 2008; Xu & Lee, 2012).

La pregătirea probelor pentru analiza instrumentală trebuie avut în vedere (Chen et al., 2021):

- (i) obținerea unei eficiențe ridicate la extracția compușilor de interes,
- (ii) compatibilitate între extractul rezultat și sistemul analitic utilizat,
- (iii) costul și timpul necesar realizării procesului de extracție,
- (iv) sustenabilitatea metodei de extracție, conform principiilor chimiei verzi.

În ultimii ani, au fost dezvoltate metode miniaturizate de pregătire a probelor pentru analiză care respectă principiile chimiei verzi (volum redus de solvent (μL), înlocuirea

solvenților toxici, consum redus de energie, diminuarea deșeurilor), au posibilitate de automatizare, prezintă grade ridicate de recuperare și factori de preconcentrare și necesită un volum (mL) redus de probă (Seidi et al., 2019; Samadifar et al., 2023).

Metodele miniaturizate dezvoltate atât pentru pentru extracția lichid-lichid (Beldean-Galea, 2017) cât și **pentru extracția pe fază solidă** (Samadifar et al., 2023) se bazează pe aceleași principii clasice de extracție. *Microextracția lichid-lichid* (LLME, *liquid-liquid microextraction*) se realizează într-o singură etapă, iar extractul final nu necesită concentrare, deoarece volumul de solvent utilizat este de ordinul microlitrilor. Sistemul de extracție este unul terțiar, fiind constituit din proba lichidă, solventul de extracție și solventul de dispersie cu rol în dispersia micropicăturilor de solvent de extracție în probă. *Microextracția pe fază solidă* (SPME, *solid-phase microextraction*) se realizează prin adsorbția pe o fază staționară solidă a compușilor de interes din proba de analizat, urmată de eluarea lor (Chen et al., 2021).

Microextracția medicamentelor studiate a fost realizată prin microextracția dispersivă lichid-lichid (DLLME, *Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction*) (Rezaee et al., 2006); DLLME-SFO(D) – Microextracție Dispersivă Lichid-Lichid cu Solidificarea Solventului de Extracție (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction based on Solidification of Floating Organic Droplet*) (Leong & Huang, 2008) și extracția pe fază solidă (SPE, *Solid-Phase Extraction*) pe cartușe Strata X (Xu & Lee, 2012).

Tehnici cromatografice de analiză

Tehnicile cromatografice de analiză sunt tehnici analitice de separare utilizate la separarea, identificarea și determinarea calitativă și cantitativă a unor amestecuri complexe.

În prezent, creșterea performanței instrumentației analitice prin specificitate și selectivitate ridicată, a făcut posibilă evaluarea calitativă și cantitativă a medicamentelor în diferite tipuri de matrici complexe, cum sunt: fluide biologice, alimente, sol, apă de suprafață, ape uzate. Medicamentele prezintă o gamă largă de compuși cu proprietăți fizico-chimice diferite, ceea ce face ca determinarea lor să fie o adevărată provocare analitică datorată numărului ridicat de compuși prezenți în mediu, naturii acestora (de la compuși nepolari la mediu polari și la foarte polari, respectiv de la compuși cu volatilitate scăzută la cei cu volatilitate ridicată), dar și a concentrațiilor la nivel de urme și ultraurme regăsite în matrici complexe.

Optimizarea parametrilor metodelor analitice (cromatografia în fază lichidă, cromatografia în fază gazoasă, spectrometria de masă sau spectrometria de masă în tandem) este crucială în dezvoltarea și aplicarea cu succes a metodei analitice în vederea determinării compușilor de interes din probe.

Creșterea remarcabilă a numărului de publicații privind prezența medicamentelor în apele din întreaga lume a fost înregistrată după anii 2000, ca urmare a consumului crescător de medicamente în societate, fapt care duce la poluarea apelor și, în consecință, are efecte negative asupra stării de sănătate a populației, dar și a animalelor (Moeder et al., 2000; Öllers et al., 2001; Jux et al., 2002; Hilton & Thomas, 2003; Cahill et al., 2004; Zuccato et al., 2005; Cui et al., 2006; MacLeod et al., 2007; Gros et al., 2008; Zhao et al., 2009; Parrilla Vázquez et al., 2010; van Nuijs et al., 2011; Herrero et al., 2012; Lai et al., 2013; Kankaanpää et al., 2014; Beldean-Galea et al., 2015; Lai et al., 2016; Baz-Lomba et al., 2017; Duan et al., 2018; Fang et al., 2019; Iancu et al., 2020; Yan et al., 2021; Ofrydopoulou et al., 2022; Santana-Viera et al., 2023; Li et al., 2024).

Tehnica analitică frecvent utilizată pentru determinarea medicamentelor din ape uzate în studiile WBE este cromatografia în fază lichidă de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă în tandem cu triplu cuadрупol (LC–QqQ-MS/MS) (Skees et al., 2018; Nguyen et al., 2018; Zhang et al., 2019; Lei et al., 2021; Galani et al., 2021; Tomsone et al., 2022; Han et al., 2022; Kannan et al., 2023; Gao et al., 2023; Li et al., 2024). Datorită polarității compușilor, separarea se realizează pe faze staționare C₁₈ (Nguyen et al., 2018; Zhang et al., 2019; Wang et al., 2020; Lei et al., 2021; Yan et al., 2021; Han et al., 2022; Kannan et al., 2023; Gao et al., 2023). Fazele mobile sunt apă cu acizi (formic, acetic), săruri (formiat de amoniu, acetat de amoniu), acetonitril sau metanol (Skees et al., 2018; Nguyen et al., 2018; Zhang et al., 2019; Gonçalves et al., 2019; Lei et al., 2021; Galani et al., 2021; Tomsone et al., 2022; Han et al., 2022; Kannan et al., 2023; Gao et al., 2023; Li et al., 2024). Ionizarea compușilor în metoda de analiză LC-MS/MS poate fi în mod pozitiv sau negativ (Galani et al., 2021).

PARTEA a II-a – CONTRIBUȚII ORIGINALE

Determinarea consumului unor medicamente în rândul populației din Cluj-Napoca prin metoda epidemiologiei bazate pe ape uzate

Probele de apă uzată au fost prelevate de la Stația de epurare a Municipiului Cluj-Napoca, România, la care sunt arondate și patru comune limitrofe (Florești, Gilău, Baciș și Săvădisla). Stația de epurare a apelor uzate este constituită din trei trepte (mecanică, biologică și chimică), fiecare treaptă având un rol specific și bine-definit în procesul de epurare a apelor uzate. În studiul WBE, probele compozite de apă uzată au fost colectate din influentul stației de epurare care este format din apa menajeră, apa industrială și apa meteorică din sistemul de canalizare care deserveste o populație de peste 400.000 de locuitori.

Sunt prezentate trei studii de caz privind determinarea consumului unor medicamente în rândul populației din Cluj-Napoca prin metoda epidemiologiei bazate pe ape uzate, și anume:

- (i) Paracetamol și antiinflamatoare nesteroidiene,
- (ii) Hormoni steroidieni și
- (iii) beta-Blocante.

STUDIUL DE CAZ Nr. 1. Paracetamol și antiinflamatoare nesteroidiene

Paracetamolul este folosit în cazul simptomelor asociate gripelor și răcelilor, durerilor de cap, precum și în cazul indivizilor alergici la aspirină (Boumya et al., 2021).

Antiinflamatoarele nesteroidiene sunt, în general, sigure și eficiente în gestionarea durerii (dureri de cap, de dinți, musculo-scheletice, respectiv post-operatorii, dismenoree și răceală comună) pe termen scurt, de la moderat până la sever. Sunt analgezice nenarcotice, cu sau fără prescripție medicală, utilizate pe scară largă, singure sau împreună cu alte medicamente (Garg, 2009). Sunt eficiente în ameliorarea episoadelor dureroase la pacienții cu boli cronice (osteoartrită), reduc riscul de a dezvolta cancer și produc regresia tumorilor. Consumul de antiinflamatoare nesteroidiene nu produce dependență asemenea opioidelor (Bindu et al., 2020), dar în cazul unui abuz sau consum prelungit pot apărea leziuni gastrointestinale, cardiovasculare, renale și chiar poate surveni decesul (Moore et al., 2015; Bindu et al., 2020; Uzzaman et al., 2023). Antiinflamatoarele nesteroidiene sunt persistente, greu degradabile și se acumulează în factorii de mediu (Rastogi et al., 2021).

Antiinflamatoarele nesteroidiene sunt derivați ai acizilor carboxilici (salicilic, acetic, antranilic, enolic) care se prezintă sub o gamă largă de compuși cu proprietăți antipiretice, analgezice și antiinflamatorii (Feng et al., 2013; Harvey & Cuculici, 2013; Bindu et al., 2020; Huynh et al., 2023).

În teza de doctorat sunt prezentate diferite abordări cu privire la posibilitățile de analiză și de extracție din apele uzate ale paracetamolului și a celor patru antiinflamatoare nesteroidiene luate în studiu (paracetamol – PARA, ketoprofen – KET, naproxen – NAP, Diclofenac – DIC și ibuprofen – IBU), precum și modul în care s-a realizat estimarea consumului în cele două perioade de prelevare (*septembrie 2021 și februarie 2022*).

Optimizarea metodelor cromatografice de analiză (HPLC-PDA, GC-MS-SIM, LC-MS/MS)

Analiza paracetamolului și a antiinflamatoarelor nesteroidiene studiate prin cromatografia de înaltă performanță

Paracetamolul și cele patru antiinflamatoare nesteroidiene studiate au fost analizate prin trei metode cromatografice de înaltă performanță cuplate cu diferiți detectori:

- (i) Cromatografia în fază lichidă de înaltă performanță cuplată cu detector cu fotodiode (HPLC-PDA, *High Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detector*);
- (ii) Cromatografia în fază gazoasă de înaltă performanță cuplată spectrometru de masă cu mod SIM (GC-MS-SIM, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Selected Ions Monitoring*);
- (iii) Cromatografia în fază lichidă de înaltă performanță cuplată cu spectrometru de masă în tandem (LC-MS/MS, *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*).

Concluziile STUDIULUI DE CAZ Nr. 1.

Paracetamol și antiinflamatoare nesteroidiene

Acest studiu reprezintă prima încercare din România de a estima consumul de paracetamol și de antiinflamatoarelor nesteroidiene (ketoprofen, naproxen, ibuprofen și diclofenac) în rândul populației utilizând epidemiologia bazată pe ape uzate.

În acest scop, au fost dezvoltate și validate următoarele metode de analiză și de extracție.

Metoda **HPLC-PDA** elaborată și validată pentru medicamentele studiate prezintă liniaritate acceptabilă ($R^2 > 0,9969$) în intervalul de concentrație 0,25–10 mg/L, cu precizii bune *intraday* ($RSD \leq 2,15\%$) și *interday* ($RSD \leq 3,19\%$), limite scăzute de detecție și de cuantificare ale instrumentului (10–30 $\mu\text{g/L}$; 40–90 $\mu\text{g/L}$), precum și ale metodei (40–120 ng/L; 160–200 ng/L). Cu toate acestea, metoda HPLC-PDA nu a fost suficient de specifică și selectivă pentru analiza paracetamolului și a antiinflamatoarelor nesteroidiene din probele de apă uzată.

Metoda **GC-MS-SIM** dezvoltată și validată în intervalul 0,667–10 mg/L are o liniaritate bună ($R^2 > 0,9872$), precizie satisfăcătoare *intraday* ($RSD \leq 12,23\%$) și *interday* ($RSD \leq 12,68\%$), limite joase de detecție (30–150 $\mu\text{g/L}$) și de cuantificare (90–440 $\mu\text{g/L}$) atât ale instrumentului, cât și limitele de detecție (6–30 ng/L) și cuantificare ale metodei (18–88 ng/L). Această metodă a fost utilizată cu succes la cuantificarea paracetamolului și a antiinflamatoarelor nesteroidiene studiate din probele de apă, datorită identificării duble bazate pe Ionul Molecular Selectat (m/z) și a timpului de retenție. Dezavantajul metodei constă în timpul mai lung de procesare a probelor, deoarece compuşii necesită derivatizare care a fost realizată cu agentul de derivatizare BSTFA:TMCS (99:1, v/v).

Metoda **LC-MS/MS** dezvoltată și validată prezintă o liniaritate satisfăcătoare ($R^2 > 0,9872$) în intervalul de concentrație 10–2000 ng/mL, cu o precizie acceptabilă *intraday* ($RSD \leq 14,05\%$) și *interday* ($RSD \leq 7,58\%$), având limite de detecție (6–52 $\mu\text{g/L}$) și de cuantificare (18,2–158 $\mu\text{g/L}$) scăzute atât ale instrumentului cât și limitele de detecție (6–52 ng/L) și cuantificare ale metodei (18,2–158 ng/L). Această metodă permite cuantificarea paracetamolului și a antiinflamatoarelor nesteroidiene din probele de apă uzată, fără a fi necesară o etapă suplimentară, precum în cazul metodei GC-MS-SIM.

În urma testării celor două metode de extracție (extracția lichid-lichid și extracția pe fază solidă), am observat faptul că **extracția pe fază solidă** realizată pe cartuşul Strata-X, cu un pH 3 al probei, oferă cele mai bune grade de recuperare pentru compuşii studiați (paracetamol 41,57%; ketoprofen 91,89%; naproxen 91,62%; diclofenac 87,72%; și ibuprofen 93,75%). Celelalte cartușe de extracție considerate au fost C18-U și C18-E, dar gradele de recuperare nu au fost satisfăcătoare. În cazul extracției lichid-lichid, prezența impurităților în extractul final, în urma utilizării acetatului de etil, perturbă analiza, iar la utilizarea amestecului *n*-hexan:izopropanol (3:2, v/v) nu are loc extracția paracetamolului.

Metoda de analiză **GC-MS-SIM** a fost aplicată unor probe de apă uzată, colectate din fose septice și din influentul unor stații de epurare. Concentrațiile medicamentelor studiate regăsite se situează de la nedetectabil până la anumite valori, după cum urmează: n.d.–224,11 ng/L pentru paracetamol; n.d.–2.705,10 ng/L pentru ketoprofen; n.d.–1.743,40 ng/L pentru naproxen; n.d.–16.967,80 ng/L pentru diclofenac; și n.d.–2.436,70 ng/L pentru ibuprofen. Determinarea acestora, atât în fose septice, cât și în diferite stații de epurare arată utilizarea lor comună pentru diverse afecțiuni, precum și persistența lor.

Metoda **LC-MS/MS** aplicată probelor de apă uzată colectate din influentul stației de epurare din Cluj-Napoca, în cele două perioade, a permis determinarea concentrațiilor prezentate în continuare: *campania septembrie 2021* – concentrațiile au variat în intervalele 6,46–24,83 µg/L pentru paracetamol; 0,90–9,34 µg/L pentru ketoprofen; 1,28–1,92 µg/L pentru naproxen; 2,50–5,06 µg/L pentru ibuprofen; și 0,97–3,04 µg/L pentru diclofenac, în timp ce în *campania februarie 2022* – concentrațiile au variat în intervalele 0,88–12,14 µg/L pentru paracetamol; 0,75–3,66 µg/L pentru ketoprofen; 1,44–2,62 µg/L pentru naproxen; 1,33–5,52 µg/L pentru ibuprofen; și 1,12–2,36 µg/L pentru diclofenac. Aceste concentrații corespund unui consum în luna *septembrie 2021* între 44,60–185,57 g/zi/1000loc paracetamol; 0,25–2,65 g/zi/1000loc ketoprofen; 0,29–0,46 g/zi/1000loc naproxen; 0,55–1,15 g/zi/1000loc ibuprofen; și 0,23–0,73 g/zi/1000loc diclofenac, iar pentru luna *februarie 2022* între 6,65–93,46 g/zi/1000loc paracetamol; 0,21–0,99 g/zi/1000loc ketoprofen; 0,35–0,60 g/zi/1000loc naproxen; 0,32–0,61 g/zi/1000loc ibuprofen; și 0,27–0,57 g/zi/1000loc diclofenac.

Azotul amoniacal este parametrul hidrochimic luat în considerare pentru estimarea populației conectate la sistemul de canalizare (524.394 locuitori pentru septembrie 2021, respectiv 498.718 locuitori pentru februarie 2022), fiind specific excreției urinare, fără a fi afectat de activitățile industriale, casnice, dar este afectat de sezonul ploios.

Valorile ridicate ale consumului estimat al acestor medicamente în cadrul studiului efectuat poate fi asociat numărului mare de cazuri SARS-CoV-2 pozitive raportate, sezonului gripal, precum și afecțiunilor reumatice.

Comparând valorile obținute ale consumului de medicamente cu alte valori din diferite studii, se observă că valorile paracetamolului sunt în concordanță cu aceste valori, în timp ce pentru ketoprofen și diclofenac valorile estimate sunt mai mari, iar pentru naproxen și ibuprofen sunt mai mici.

STUDIUL DE CAZ Nr. 2. Hormoni steroidieni

Hormonii sau mesagerii chimici sunt substanțe secretate de glandele endocrine sau de alte țesuturi care îndeplinesc funcții specifice de stimulare și coordonare a activității anumitor organe sau a întregului organism.

Glandele endocrine, țesuturile care produc hormoni, precum și hormonii și receptorii hormonalți constituie sistemul endocrin. În funcție de structura lor moleculară, hormonii pot fi grupați în polipeptide, steroizi, amine și eicosanoide (Johnstone et al., 2014).

Hormonii steroidieni (steroizii) sunt prezenți în plante, animale și oameni. Pot fi clasificați în corticosteroizi (adrenocorticoizi) și gonadocorticoizi (hormoni sexuali: androgeni, estrogeni, progesteroni) (Liu et al., 2021), alcătuind un grup de compuși biologic activi, derivați din colesterol, având în structură un nucleu de tip ciclopentanoperhidrofenantrenic format din trei inele ciclohexanice și un inel ciclopentanic (Cui et al., 2006). Procesul de formare a hormonilor steroidieni se numește steroidogeneză, iar sursa principală o constituie lipoproteinele cu densitate scăzută (colesterolul LDL) (Samavat & Kurzer, 2015).

În funcție de origine, hormonii estrogeni pot fi clasificați în (Hamid & Eskicioglu, 2012; Domínguez-López et al., 2020): (i) estrogeni naturali (estrone, estriol, estradiol); (ii) estrogeni de sinteză (17- α -etinilestradiol); (iii) estrogeni vegetali sau fitoestrogeni (izoflavone, cumestani) și (iv) estrogeni fungici sau micoestrogeni (zearalenonă).

Estrogenii naturali sunt secretați de cortexul suprarenal, testicule, ovare și placenta, fiind prezenți atât în organismul feminin cât și cel masculin, dar la concentrații mai mici (Cui et al., 2006; Ojoghor et al., 2021). Acești hormoni au rol în creșterea și funcționarea armonioasă a organismului, sănătatea sistemului reproducător, cardiovascular, osos, gastrointestinal, precum și în comportamentul cognitiv (Adeel et al., 2017; Ojoghor et al., 2021; Liu et al., 2021). Lipsa hormonilor sau dezechilibrele hormonale pot duce la cancer, obezitate, diabet și boli de inimă (Almazrouei et al., 2023).

Medicina veterinară utilizează estrogenii naturali și sintetici pentru a trata disfuncțiile sistemului reproducător al vacilor și al iepurilor, dar și ca promotori de creștere (Adeel et al., 2017; Ojoghor et al., 2021; Almazrouei et al., 2023).

Hidrocortizonul și 17- α -etinilestradiolul fac parte din lista medicamentelor esențiale ale Organizației Mondiale a Sănătății (OMS, 2021).

Excreția endogenă, utilizarea în scopuri terapeutice sau în sectorul zootehnic a hormonilor steroidieni alimentează în mod constant prezența acestora în factorii de mediu, în

special în apă (Adeel et al., 2017). Hormonii steroidieni sunt perturbatori endocrini și produc dezechilibre în biosinteza, metabolismul sau activitatea hormonilor (Almazrouei et al., 2023).

Studiul de caz nr. 2 prezintă metoda de analiză HPLC-PDA și metoda de extracție pe fază solidă a hormonilor steroidieni studiați din apele uzate prelevate pentru a determina încărcarea normalizată cu aceștia.

Hormonii steroidieni studiați (estriol, 17- β -estradiol, estronă, 17- α -etinilestradiol, hidroclortizon) sunt acizi foarte slabi (valorile pKa între 10,30 și 12,59) și cu caracter ușor lipofil (valorile logP între 1,61 și 3,94).

Concluziile STUDIULUI DE CAZ Nr. 2. Hormoni steroidieni

Acest studiu este prima tentativă din România de investigare a încărcării cu hormoni steroidieni folosind metodologia epidemiologiei bazată pe ape uzate.

În acest scop, a fost optimizată și validată cu succes o metodă **HPLC-PDA**. Metoda prezintă liniaritate bună ($R^2 > 0,9977$) într-un interval de concentrație de 1,56–50 mg/L, precizie *intraday* ($RSD \leq 2,69\%$) și precizie *interday* ($RSD \leq 3,11\%$) ridicate, limite de detecție și de cuantificare scăzute atât ale instrumentului (0,076–0,233 mg/L; 0,230–0,705 mg/L) cât și ale metodei (0,114–0,163 μ g/L; 0,345–1,057 μ g/L).

Extracția pe fază solidă a hormonilor steroidieni din probele de apă uzată s-a realizat utilizând cartușele Strata-X, iar proba acidificată la pH 3. Gradele de recuperare obținute sunt: estriol 93,22%; 17- β -estradiol 89,99%; estronă 80,01%; 17- α -etinilestradiol 84,03% și hidroclortizon 86,75%.

În urma analizei probelor de ape uzate din septembrie 2021, concentrația hormonilor a fost următoarea: estriol 2,67–104,50 μ g/L; 17- β -estradiol n.d.–2,47 μ g/L; estronă n.d.–22,42 μ g/L; 17- α -etinilestradiol n.d.–0,65 μ g/L și hidroclortizon n.d.–0,11 μ g/L. Pentru probele din februarie 2022, concentrațiile de hormoni au fost: estriol 6,46–18,80 μ g/L; 17- β -estradiol n.d.–0,03 μ g/L; estronă n.d.–4,35 μ g/L. Hormonii 17- α -etinilestradiol și hidroclortizon nu au fost detectați.

Încărcarea corespunzătoare a acestor concentrații variază în următoarele intervale:

- (i) **septembrie 2021**, valorile calculate sunt: 0,60–23,81 g/zi/1000loc pentru estriol; n.d.–0,56 pentru g/zi/1000loc 17- β -estradiol; n.d.–5,11 g/zi/1000loc pentru estronă; n.d.–0,15 g/zi/1000loc pentru 17- α -etinilestradiol; și n.d.–0,02 g/zi/1000loc pentru hidroclortizon.

- (ii) **februarie 2022**, valorile calculate sunt: 1,49–4,28 g/zi/1000loc pentru estriol; n.d.–0,01 g/zi/1000loc pentru 17- β -estradiol; n.d.–0,98 g/zi/1000loc pentru estronă; valorile pentru 17- α -etinilestradiol și hidroclotizon nu au fost calculate deoarece acești hormoni nu au fost detectați în probele de apă.

Epidemiologia bazată pe ape uzate aplicată în cercetarea noastră ar putea fi folosită ca instrument de monitorizare a tendințelor de utilizare a hormonilor steroidieni în comunitate, dar trebuie ținut cont de: (i) stabilitatea acestora (în canalizare și în probă), (ii) transformarea datorită activității microbiene, (iii) specificitatea hormonilor (excreție sau consum), (iv) metabolismul uman, (v) afinitatea acestora față de solide datorită hidrofobicității lor, precum și (vi) cunoașterea corectă a numărului de locuitori conectați la sistemul de canalizare.

STUDIUL DE CAZ Nr. 3. beta-Blocante

Medicamentele **beta-blocante** (β -blocante sau antagoniști β -adrenergici) sunt primele medicamente pentru afecțiunile cardiovasculare și reprezintă terapia de bază în tratamentul bolilor de inimă, în special în insuficiența cardiacă, infarctul miocardic acut, hipertensiune, angină pectorală, aritmii, dar și anxietate, atacuri de panică, migrenă, hipertiroidism, precum și medicație topică pentru glaucom cu unghi deschis (Bekhradnia & Ebrahimzadeh, 2012; Dissanayake & Wahl, 2014; Parrilla Vázquez et al., 2014; Poirier & Tobe, 2014).

Datorită efectelor calmante, beta-blocantele pot fi utilizate abuziv pentru a atenua stările de anxietate, fiind prezente în cazul dopajului sportivilor (Gonçalves et al., 2019; Chen et al., 2023), în prevenirea stresului și a morții animalelor în drumul acestora spre abatoare (Xu et al., 2019) sau în cazul curselor de cai (Lee et al., 2007).

Efectele adverse ale utilizării beta-blocantelor constau în bradicardie, astm, amețeli, vărsături, depresie, impotență, insomnie, comă, potențial mutagenic, iar în cazul supradozajului accidental sau intenționat duc la moarte, mai ales în cazul pacienților cu insuficiență renală sau hepatică (Barron et al., 2013; Dissanayake & Wahl, 2014; Chen et al., 2023). Derivații nitro și N-nitrozo ai beta-blocantelor sunt genotoxici, cancerigeni, mutageni și pot provoca leziuni hepatice. Acești derivați se formează în tractul gastrointestinal, în urma reacțiilor dintre grupările funcționale amină și amidă ale beta-blocantelor cu acidul gastric din stomac (Sarvestani et al., 2021).

beta-Blocantele sunt considerate poluanți pseudo-persistenți, cu timpi de înjumătățire în apă între 0,4–13,1 $\pm$ 0,9 zile (Ramil et al., 2010; Xu et al., 2019). Maszkowska et al. (2014)

au arătat că beta-blocantele afectează nivelul de testosteron din organisme de sex masculin, asemenea perturbatorilor endocrini. Expunerea cronică sau acută a organismelor din mediu la medicamente provoacă efecte negative asociate creșterii, reproducerii și chiar morții acestora (Xu et al., 2019).

În teza de doctorat sunt prezentate diferite abordări cu privire la posibilitățile de analiză și de extracție ale medicamentelor beta-blocante din ape uzate. Concentrațiile beta-blocantelor determinate vor fi utilizate pentru estimarea consumului în rândul populației în două perioade diferite (februarie 2024 și octombrie 2024).

Medicamentele beta-blocante studiate sunt: atenolol, nadolol, pindolol, acebutolol, metoprolol, bisoprolol, propranolol, betaxolol. Sunt compuși slab alcalini, fiind amine secundare, cu valori pKa între 9,21 și 9,67, având caracter hidrofil ($\log P$ 0,16–3,48) (Iancu et al., 2019).

Concluziile STUDIULUI DE CAZ Nr. 3. beta-Blocante

Acest studiu este prima încercare din România de a investiga consumul de medicamente beta-blocante (atenolol, nadolol, pindolol, acebutolol, metoprolol, propranolol, betaxolol) în rândul populației utilizând epidemiologia bazată pe ape uzate.

În acest scop au fost elaborate și validate următoarele metode de analiză și extracție pentru medicamentele beta-blocante.

Metoda de analiză **HPLC-PDA** pentru medicamentele beta-blocante studiate prezintă timpi de retenție bine definiți, o bună liniaritate ($R^2 > 0,9950$) în intervalul de concentrație de 1,56–50 $\mu\text{g/mL}$, o precizie *intraday* ($\text{RSD} \leq 2,60\%$) și *interday* ($\text{RSD} \leq 1,68\%$) ridicată, limite de detecție (0,07–0,15 $\mu\text{g/mL}$) și cuantificare (0,20–0,45 $\mu\text{g/mL}$) scăzute.

Metoda de analiză **GC-MS-SIM** se remarcă prin: o bună liniaritate ($R^2 > 0,9981$) în intervalul de concentrație de 1,56–100 $\mu\text{g/mL}$, precizii satisfăcătoare *intraday* ($\text{RSD} \leq 7,38\%$) și *interday* ($\text{RSD} \leq 14,91\%$), limite scăzute de detecție (0,13–0,69 $\mu\text{g/mL}$) și cuantificare (0,39–2,10 $\mu\text{g/mL}$).

Metoda **LC-MS/MS** prezintă timpi de retenție și ioni moleculari specifici bine definiți, o liniaritate bună ($R^2 > 0,99854$) în intervalul de concentrație de 1–200 ng/mL și o acuratețe ridicată ($> 91,66\%$), limite scăzute de detecție (0,08–0,22 ng/mL) și cuantificare (0,15–0,44 ng/mL).

Utilizarea cartușelor de extracție pe fază solidă C18-U a permis izolarea beta-blocantelor studiate din probele de apă uzată. Gradul de recuperare realizat la pH 10 variază astfel: atenolol 21,70%, nadolol 94,22%, pindolol 85,40%, acebutolol 89,30%, metoprolol 93,54%, bisoprolol 92,30%, propranolol 88,68%, betaxolol 91,94%.

Microextracția **DLLME-SFO** optimizată statistic și aplicată probelor de apă uzată prezintă valori bune ale gradului de recuperare relativă îmbogățită care variază de la 58,94 la 86,40%, cu excepția atenololului (1,58%) și a nadololului (19,20%), iar factorul de preconcentrare cu valori între 60,14 și 86,40, excepție făcând atenololul (1,61) și nadololul (19,60).

Microextracția **DLLME** optimizată statistic și aplicată probelor de apă uzată arată valori bune ale gradului de recuperare relativă îmbogățită variind de la 63,34 la 82,13%. Atenololul nu a fost extras, în timp ce pentru nadolol recuperarea a fost de 3,95%. Factorul de preconcentrare a avut valori între 190,03 și 246,38, excepție făcând nadololul (11,85), iar pentru atenolol nu a fost calculat.

Microextracțiile optimizate **DLLME-SFO** și **DLLME** permit extracția a șase beta-blocante din cele opt studiate, cu grade de recuperare satisfăcătoare. Prin comparare cu celelalte microextracții prezentate în alte cercetări, o singură cercetare încearcă să izoleze un număr de cinci medicamente prin microextracția DLLME.

Metodă de analiză **LC-MS/MS** a fost aplicată probelor de apă uzată colectate din influentul stației de epurare în vederea cuantificării beta-blocantelor studiate. Concentrațiile regăsite în cele două campanii au următoarele intervale de valori: *februarie 2024* – 5,76–8,28 ng/L atenolol; n.d.–0,12 ng/L nadolol; n.d.–0,004 ng/L pindolol; n.d.–0,25 ng/L acebutolol; 0,09–0,13 ng/L propranolol; 0,15–0,25 ng/L betaxolol; și 25,51–124,59 ng/L metoprolol; *octombrie 2024* 0,09–0,21 ng/L atenolol; n.d.–0,03 ng/L nadolol; iar pindololul și acebutololul nu au fost detectați; 0,01–0,04 ng/L propranolol; n.d.–0,06 ng/L betaxolol; 35,01–57,84 ng/L metoprolol. Aceste concentrații corespund următoarelor *valori ale consumului* pentru luna *februarie 2024*: 2,36–3,07 mg/zi/1000loc atenolol; n.d.–0,10 mg/zi/1000loc nadolol; n.d.–0,01 mg/zi/1000loc pindolol; n.d.–0,13 mg/zi/1000loc acebutolol; 0,48–0,72 mg/zi/1000loc propranolol; 0,23–0,38 mg/zi/1000loc betaxolol; 54,85–276,45 mg/zi/1000loc metoprolol; pentru luna *octombrie 2024*: 0,03–0,08 mg/zi/1000loc atenolol; n.d.–0,03 mg/zi/1000loc nadolol; iar pentru pindolol și acebutolol nu a fost calculat consumul; 0,04–0,19 mg/zi/1000loc propranolol; 0,05–0,07 mg/zi/1000loc betaxolol; 68,93–111,65 mg/zi/1000loc metoprolol.

În aplicarea epidemiologiei bazate pe ape uzate pentru determinarea consumului de medicamente în rândul populației, estimarea populației s-a realizat pe baza azotului amoniacal, deoarece este parametrul hidrochimic provenit în urma hidrolizei ureei, fiind specific urinei.

În cadrul studiului desfășurat se observă faptul că o temperatură ambientală scăzută, crește consumul de medicamente beta-blocante, datorită efortului suplimentar depus de sistemul cardiovascular de a furniza oxigen și de a menține o temperatură constantă corpului.

Prin compararea consumului estimat din cadrul studiului realizat cu alte studii din străinătate, cantitățile de metoprolol sunt în concordanță cu cele consumate în străinătate, în timp ce pentru atenolol, propranolol și betaxolol cantitățile estimate sunt mai scăzute, iar pentru nadolol, pindolol și acebutolol nu au fost găsite valori ale consumului în alte studii.

CONCLUZII FINALE

Scopul prezentei teze de doctorat a fost dezvoltarea și validarea unor metode analitice pentru cuantificarea paracetamolului, a antiinflamatoarelor nesteroidiene (ketoprofen, naproxen, diclofenac și ibuprofen), a hormonilor steroidieni (estriol, 17- β -estradiol, estronă, 17- α -etinilestradiol, și hidrocorizon) și a beta-blocantelor (atenolol, nadolol, pindolol, acebutolol, metoprolol, bisoprolol, propranolol și betaxolol) din probe de apă uzată, în urma izolării acestora prin extracția pe fază solidă, în vederea aplicării epidemiologiei bazate pe ape uzate, pentru a estima consumul acestor medicamente în rândul populației.

Rezultatele obținute în cadrul acestei teze de doctorat contribuie prin microextracția dispersivă lichid-lichid aplicată beta-blocantelor la dezvoltarea metodelor de extracție verzi, prietenoase cu mediul. Mai mult, metoda epidemiologiei bazate pe ape uzate aplicată concentrațiilor de medicamente regăsite oferă o imagine de ansamblu asupra consumului de medicamente în rândul populației în diferite perioade de timp, constituind o metodă rapidă și noninvazivă de evaluare a stării de sănătate a populației.

Cercetările efectuate în cadrul prezentei teze de doctorat pot fi sumarizate astfel:

- 1) A fost realizat un **studiu de literatură** în legătură cu:
 - ✓ Medicamentele antipiretice și antiinflamatoare utilizate în cazul îmbolnăvirii cu SARS-CoV-2, respectiv în cazul infecțiilor sezoniere;
 - ✓ Utilizarea hormonilor steroidieni pentru diferitele dezechilibre ale sistemului reproducător;
 - ✓ Utilizarea beta-blocantelor pentru tratamentul afecțiunilor cardiace, respectiv consumul abuziv datorită efectelor calmante;
 - ✓ Tehnicile de analiză cromatografică și de extracție utilizate în determinarea medicamentelor din probe de apă uzată;
 - ✓ Epidemiologia bazată pe ape uzate, respectiv etapele constitutive și aplicarea corectă a metodei (•prelevarea probelor de apă din influentul stației de epurare, selectarea biomarkerului specific compusului de interes, •determinarea numărului de locuitori arondați stației de epurare și •calculul consumului de medicamente).

- 2) Au fost **dezvoltate și optimizate metodele de analiză și de extracție** pentru cele trei clase de medicamente studiate și utilizată metoda epidemiologiei bazată pe ape uzate pentru a determina consumul acestora:

✓ *Paracetamol și antiinflamatoare nesteroidiene*

•Metoda HPLC-PDA dezvoltată și validată utilizată pentru cuantificarea paracetamolului și a antiinflamatoarelor nesteroidiene din probele de apă uzată nu a fost suficient de specifică și selectivă.

•Metoda GC-MS dezvoltată și validată a fost utilizată cu succes la determinarea concentrațiilor de paracetamol, respectiv de antiinflamatoare nesteroidiene studiate din probele de apă uzată, ca urmare a identificării compușilor pe baza ionului molecular selectat (m/z) și a timpului de retenție, dar a necesitat o etapă de lucru suplimentară, și anume derivatizarea cu BSTFA:TMCS (99:1, v/v).

•Metoda LC-MS/MS dezvoltată și validată a permis cuantificarea paracetamolului și a antiinflamatoarelor nesteroidiene studiate din probele de apă uzată, fără a fi necesară o etapă suplimentară, având limite de detecție (6–52 $\mu\text{g/L}$) și de cuantificare (18,2–158 $\mu\text{g/L}$) scăzute.

•Metoda de extracție optimă pentru izolarea paracetamolului și a antiinflamatoarelor nesteroidiene studiate a fost extracția pe fază solidă folosind cartușele de extracție Strata-X la un pH al probei de 3. Gradele de recuperare obținute sunt: paracetamol 41,57%; ketoprofen 91,89%; naproxen 91,62%; diclofenac 87,72%; și, respectiv ibuprofen 93,75%. Extracția lichid-lichid, precum și extracția pe fază solidă folosind cartușele C18-U și C18-E nu a oferit rezultate mulțumitoare.

•Concentrațiile medicamentelor studiate regăsite în probele de apă colectate din influentul stației de epurare a municipiului Cluj-Napoca, în cele două campanii de prelevare (septembrie 2021, februarie 2022), au avut valori cuprinse între: paracetamol 0,88–24,83 $\mu\text{g/L}$; ketoprofen 0,75–9,34 $\mu\text{g/L}$; naproxen 1,28–2,62 $\mu\text{g/L}$; ibuprofen 1,33–5,06 $\mu\text{g/L}$; și, respectiv diclofenac 0,97–3,04 $\mu\text{g/L}$.

•În urma aplicării metodei epidemiologiei bazate pe ape uzate în vederea estimării consumului de paracetamol și de antiinflamatoare nesteroidiene, în rândul populației, acest consum a variat în următoarele intervale: 6,65–185,57 g/zi/1000loc pentru paracetamol; 0,21–2,65 g/zi/1000loc pentru ketoprofen; 0,29–0,60 g/zi/1000loc pentru naproxen; 0,32–1,15 g/zi/1000loc pentru ibuprofen; și, respectiv 0,23–0,73 g/zi/1000loc pentru diclofenac.

•Estimarea numărului de locuitori conectați la sistemul de canalizare s-a realizat pe baza azotului amoniacal, parametrul hidrochimic care indică cel mai bine numărul de locuitori.

•Consumul ridicat de paracetamol și antiinflamatoare nesteroidiene obținut în cele două perioade investigate poate fi asociat numărului ridicat de cazuri de îmbolnăviri ca urmare a infecției cu SARS-CoV-2, a virozelor respiratorii sau a durerilor osteoarticulare.

✓ **Hormonii steroidieni**

•Metoda HPLC-PDA optimizată și validată pentru analiza hormonilor steroidieni studiați din probe de apă prezintă limite de detecție (0,076–0,233 mg/L) și de cuantificare (0,230–0,705 mg/L) scăzute, fiind eficientă în determinarea acestora.

•Utilizarea metodei de extracție pe fază solidă folosind cartușe de extracție Strata-X a permis izolarea eficientă a hormonilor steroidieni, gradele de recuperare obținute fiind următoarele: estriol 93,22%; 17- β -estradiol 89,99%; estronă 80,01%; 17- α -etinilestradiol 84,03%; și, respectiv hidrocortizon 86,75%.

•Concentrațiile hormonilor steroidieni prezente în cele optsprezece probe de apă uzată analizate (două campanii de prelevare probe: septembrie 2021 și februarie 2022) s-au situat în următoarele intervale de valori: estriol 2,67–104,50 μ g/L; 17- β -estradiol n.d.–2,47 μ g/L; estronă n.d.–22,42 μ g/L; 17- α -etinilestradiolul n.d.–0,65 μ g/L; și, respectiv hidrocortizon n.d.–0,11 μ g/L.

•În cazul hormonilor steroidieni, metoda epidemiologiei bazată pe ape uzate a fost aplicată doar pentru normalizarea cantităților determinate de medicamente în probele de apă. Această normalizare a cantităților a fost aleasă deoarece în cadrul studiului nu s-a putut face distincția dintre hormonii consumați și cei excretați în mod natural, excepțiile fiind pentru 17- α -etinilestradiol și hidrocortizon, dar acești hormoni au fost detectați doar într-o singură probă. Valorile normalizate ale încărcării cu hormoni steroidieni sunt: 0,60–23,81 g/zi/1000loc pentru estriol; n.d.–0,56 g/zi/1000loc pentru 17- β -estradiol; n.d.–5,11 g/zi/1000loc pentru estronă; n.d.–0,15 g/zi/1000loc pentru 17- α -etinilestradiol; și, respectiv n.d.–0,02 g/zi/1000loc pentru hidrocortizon.

•Estimarea numărului de locuitori conectați la sistemul de canalizare s-a realizat pe baza azotului amoniacal, parametrul hidrochimic care indică cel mai bine numărul de locuitori.

✓ **beta-Blocante**

•Metoda HPLC-PDA dezvoltată și validată a fost aplicată cu succes în cuantificarea medicamentelor beta-blocante din probele de apă, având limite de detecție (0,07–0,15 $\mu\text{g/mL}$) și de cuantificare (0,20–0,45 $\mu\text{g/mL}$) scăzute.

•Metoda GC-MS elaborată și validată a fost eficientă în determinarea beta-blocantelor din probele de apă și se remarcă prin limite de detecție (0,13–0,69 $\mu\text{g/mL}$) și de cuantificare (0,39–2,10 $\mu\text{g/mL}$) scăzute, dar această metodă necesită derivatizarea medicamentelor cu BSTFA:TMCS (99:1, v/v) anterior analizei cromatografice.

•Metoda LC-MS/MS dezvoltată și validată pentru analiza beta-blocantelor prezintă limite de detecție (0,08–0,22 ng/mL) și de cuantificare (0,15–0,44 ng/mL) scăzute, fiind adecvată determinării acestor medicamente din probele de apă uzată.

•Metoda de extracție pe fază solidă elaborată pentru izolarea beta-blocantelor, utilizând cartușele de extracție C18-U, a oferit grade de recuperare optime, după cum urmează: nadolol 94,22%; pindolol 85,40%; acebutolol 89,30%; metoprolol 93,54%; bisoprolol 92,30%; propranolol 88,68%; betaxolol 91,94%; excepția constituind-o atenololul cu doar 21,70%.

•Necesitatea aplicării principiilor chimiei verzi în etapa de extracție, precum și numărul redus de studii disponibile referitoare la aceste microextracții aplicate beta-blocantelor, au condus la încercarea de a izola beta-blocantele utilizând microextracțiile DLLME-SFO și DLLME. Aceste microextracții au oferit valori satisfăcătoare pentru gradele de recuperare și factorii de preconcentrare. Astfel, gradele de recuperare pentru DLLME-SFO au variat de la 59,99 la 87,55%, excepțiile fiind atenololul cu 14,71% și nadololul cu 29,85%. Factorii de preconcentrare au valori între 61,22 și 89,34, cu excepția atenololului (15,01) și a nadololului (30,46). Gradele de recuperare folosind microextracția DLLME au fost între 53,04 și 92,10%, excepțiile fiind atenololul (care nu a fost detectat) și nadololul (cu 3,14%). Factorii de preconcentrare au variat între 198,89 și 243,97, excepție făcând atenololul care nu a fost detectat și nadololul cu un factor de 11,79.

•Concentrațiile beta-blocantelor cuantificate în probele de apă uzată prelevate din influentul stației de epurare a municipiului Cluj-Napoca, în cele două perioade investigate (februarie 2024 și octombrie 2024), au avut valori situate între: atenolol 0,09–8,28 ng/L ; nadolol n.d.–0,12 ng/L ; pindolol n.d.–0,004 ng/L ; acebutolol n.d.–0,25 ng/L ; propranolol 0,01–0,13 ng/L ; betaxolol n.d.–0,25 ng/L ; și, respectiv metoprolol 25,51–124,59 ng/L .

•Estimarea consumului de medicamente beta-blocante în rândul populației utilizând metoda epidemiologiei bazată pe ape uzate a arătat valori cuprinse între: 0,03–3,74 mg/zi/1000loc pentru atenolol; n.d.–0,10 mg/zi/1000loc pentru nadolol; n.d.–0,001 mg/zi/1000loc pentru pindolol; n.d.–0,13 mg/zi/1000loc pentru acebutolol; 0,04–0,72 mg/zi/1000loc pentru propranolol; n.d.–0,38 mg/zi/1000loc pentru betaxolol; și, respectiv 54,85–276,45 mg/zi/1000loc pentru metoprolol.

•Estimarea populației conectate la sistemul de canalizare pentru beta-blocante s-a realizat pe baza azotului amoniacal, parametrul hidrochimic care indică cel mai bine numărul de locuitori.

•Consumul estimat de medicamente beta-blocante în luna februarie 2024 este mai ridicat, comparativ cu cel din luna octombrie 2024, fapt datorat temperaturii ambientale mai scăzute, ceea ce implică o nevoie mai mare de beta-blocante pentru suportul funcționării adecvate a sistemului cardiovascular.

3) Metodele analiză și metodele de extracție elaborate și validate au permis cuantificarea adecvată a medicamentelor studiate, dar au existat și câteva excepții, care necesită eforturi suplimentare pentru îmbunătățirea performanței acestora.

În concluzie, acest studiu confirmă potențialul metodei epidemiologiei bazate pe ape uzate ca metodă eficientă și valoroasă pentru estimarea tendințelor temporale ale consumului de medicamente în rândul populației, dar necesită pentru analize aparatură instrumentală de înaltă performanță sau în situații speciale de ultra-înaltă performanță.

Monitorizarea apelor uzate este o metodă complementară de supraveghere a sănătății publice, dar și a mediului înconjurător.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- Adeel M., Song X., Wang Y., Francis D., Yang Y., 2017, Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International* 99, 107–119.
- Adeleye A.S., Xue J., Zhao Y., Taylor A.A., Zenobio J.E., Sun Y., Han Z., Salawu O.A., Zhu Y., 2022, Abundance, fate, and effects of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments. *Journal of Hazardous Materials* 424, 127284.
- Almazrouei B., Islayem D., Alskafi F., Catacutan M.K., Amna R., Nasrat S., Sizirici B., Yildiz I., 2023, Steroid hormones in wastewater: Sources, treatments, environmental risks, and regulations. *Emerging Contaminants* 9, 100210.
- Barron A.J., Zaman N., Cole G.D., Wensel R., Okonko D.O., Francis D.P., 2013, Systematic review of genuine versus spurious side-effects of beta-blockers in heart failure using placebo control: Recommendations for patient information. *International Journal of Cardiology* 168, 3572–3579.
- Baz-Lomba J.A., Harman C., Reid M., Thomas K.V., 2017, Passive sampling of wastewater as a tool for the long-term monitoring of community exposure: Illicit and prescription drug trends as a proof of concept. *Water Research* 121, 221–230.
- Bekhradnia A.R., Ebrahimzadeh M.A., 2012, Theoretical study on some non-selective beta-adrenergic antagonists and correlation to their biologically active configurations. *Medicinal Chemistry Research* 21, 2571–2578.
- Beldean-Galea M.S., Coman V., Thiébaut D., Vial J., 2015, Determination of four acidic nonsteroidal anti-inflammatory drugs in wastewater samples by dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet and high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 38(4), 641–648.
- Beldean-Galea, M.S., 2017, Tehnici de Extracție și Analiză a Antioxidanților Alimentari. Risoprint Cluj-Napoca, 364 p.
- Bindu S., Mazumder S., Bandyopadhyay U., 2020, Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical Pharmacology* 180, 114147.
- Boogaerts T., Ahmed F., Choi P.M., Tschärke B., O'Brien J., De Loof H., Gao J., Thai P., Thomas K., Mueller J.F., Hall W., Covaci A., van Nuijs A.L.N., 2021, Current and future perspectives for wastewater-based epidemiology as a monitoring tool for pharmaceutical use. *Science of the Total Environment* 789, 148047.
- Boumya W., Taoufik N., Achak M., Barka N., 2021, Chemically modified carbon-based electrodes for the determination of paracetamol in drugs and biological samples. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 11, 138–154.
- Bungau S., Tit D.M., Fodor K., Cioca G., Agop M., Iovan C., Nistor-Cseppento D.C., Bumbu A., Bustea C., 2018, aspects regarding the pharmaceutical waste management in Romania. *Sustainability* 10, 2788.
- Cahill J.D., Furlong E.T., Burkhardt M.R., Kolpin D., Anderson L.G., 2004, Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1041(1-2), 171–180.
- Calisto V., Esteves V.I., 2009, Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 77, 1257–1274.
- Castiglioni S., Salgueiro-González N., Bijlsma L., Celma A., Gracia-Lor E., Beldean-Galea M.S., Mackuak T., Emke E., Heath E., Kasprzyk-Hordern B., Petkovic A., Poretti F., Rangelov J., Santos M.M., Sremacki M., Styszko K., Hernández F., Zuccato E., 2021, New psychoactive

- substances in several european populations assessed by wastewater-based epidemiology. *Water Research* 195, 116983.
- Castiglioni S., Thomas K.V., Kasprzyk-Hordern B., Vandam L., Griffiths P., 2014, Testing wastewater to detect illicit drugs: State of the art, potential and research needs. *Science of the Total Environment* 487, 613–620.
- Ceolotto N., Dollamore P., Hold A., Balne B., Jagadeesan K.K., Standerwick R., Robertson M., Barden R., Kasprzyk-Hordern B., 2024, A new Wastewater-Based Epidemiology workflow to estimate community wide non-communicable disease prevalence using pharmaceutical proxy data. *Journal of Hazardous Materials* 461, 132645.
- Chen W., Cheng X., Ma Y., Chen N., 2023, Foodborne doping and supervision in sports. *Food Science and Human Wellness* 12, 1925–1936.
- Chen X., Wu X., Luan T., Jiang R., Ouyang G., 2021, Sample preparation and instrumental methods for illicit drugs in environmental and biological samples: A review. *Journal of Chromatography A* 1640, 461961.
- Chen Y., Guo Z., Wang X., Qiu C., 2008, Sample preparation. *Journal of Chromatography A* 1184, 191–219.
- Choi S., Lee W., Son H., Lee W., Choi Y., Yeom H., Seo C., Lee H., Lee Y., Lim S.J., Chae S.H., Park H.K., Hong S.W., Kim Y.M., Lee Y., 2024, Occurrence, removal, and prioritization of organic micropollutants in four full-scale wastewater treatment plants in Korea. *Chemosphere* 361, 142460.
- Cui C.W., Ji S.L. Ren H.Y., 2006, Determination of steroid estrogens in wastewater treatment plant of a contraceptives producing factory. *Environmental Monitoring and Assessment* 121, 409–419.
- Dissanayake V., Wahl M., 2014, Beta-Blockers. *Encyclopedia of Toxicology* 1, 438–441.
- Domínguez-López I., Yago-Aragón M., Salas-Huetos A., Tresserra-Rimbau A., Hurtado-Barroso S., 2020, Effects of dietary phytoestrogens on hormones throughout a human lifespan: A Review. *Nutrients* 12, 2456.
- Duan L., Zhang Y., Wang B., Deng S., Huang J., Wang Y., Yu G., 2018, Occurrence, elimination, enantiomeric distribution and intra-day variations of chiral pharmaceuticals in major wastewater treatment plants in Beijing, China. *Environmental Pollution* 239, 473–482.
- Escola Casas M., Schroter N.S., Zammit I., Castano-Trias M., Rodriguez-Mozaz S., Gago-Ferrero P., Corominas Ll., 2021, Showcasing the potential of wastewater-based epidemiology to track pharmaceuticals consumption in cities: Comparison against prescription data collected at fine spatial resolution. *Environment International* 150, 106404.
- EUDA (European Union Drugs Agency), 2024, Wastewater Analysis and Drugs – a European Multi-City Study (Last updated: 20 March 2024). <https://www.euda.europa.eu/publications/html/pods/waste-water-analysis_en#sourceData> [accesat 12.03.2025].
- Fang T.Y., Praveena S.M., Aris A.Z., Ismail S.N.S., Rasdi I., 2019, Quantification of selected steroid hormones (17b-Estradiol and 17a-Ethynylestradiol) in wastewater treatment plants in Klang Valley (Malaysia). *Chemosphere* 215, 153–162.
- Feng L., van Hullebusch E.D., Rodrigo M.A., Esposito G., Oturan M.A., 2013, Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. A review. *Chemical Engineering Journal* 228, 944–964.
- Galani A., Alygizakis N., Aalizadeh R., Kastritis E., Dimopoulos M.-A., Thomaidis N.S., 2021, Patterns of pharmaceuticals use during the first wave of COVID-19 pandemic in Athens, Greece as revealed by wastewater-based epidemiology. *Science of the Total Environment* 798, 149014.

- Gao Z., Sun H., Xie Y., Ren Y., 2023, Assessment of the excretion of oxidative stress biomarkers and anabolic steroids based on sewage: A case study of college students and the general population. *Science of the Total Environment* 878, 163079.
- Garg, U., 2009, *Chromatography in therapeutic drug monitoring of nonnarcotic analgesics and antiinflammatory drugs*. In: Dasgupta, A. (Ed.), *Advances in Chromatographic Techniques for Therapeutic Drug Monitoring* (1st ed.). CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New Year, pp. 385–394.
- Gonçalves R., Ribeiro C., Cravo S., Cunha S. C., Pereira J.A., Fernandes J.O., Afonso C., Tiritan M.E., 2019, Multi-residue method for enantioseparation of psychoactive substances and beta blockers by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 1125, 121731.
- González-González R.B., Sharma P., Singh S.P., Américo-Pinheiro J.H.P., Parra-Saldívar R., Bilal M., Iqbal H.M.N., 2022, Persistence, environmental hazards, and mitigation of pharmaceutically active residual contaminants from water matrices. *Science of the Total Environment* 821, 153329.
- Gracia-Lor E., Castiglioni S., Bade R., Been F., Castrignanò E., Covaci A., González-Mariño I., Hapeshi E., Kasprzyk-Hordern B., Kinyua J., Lai F.Y., Letzel T., Lopardo L., Meyer M.R., O'Brien J., Ramin P., Rousis N.I., Rydevik A., Ryu Y., Santos M.M., Senta I., Thomaidis N.S., Veloutsou S., Yang Z., Zuccato E., Bijlsma L., 2017, Measuring biomarkers in wastewater as a new source of epidemiological information: Current state and future perspectives. *Environment International* 99, 131–150.
- Gros M., Pizzolato T.-M., Petrovic M., Lopez de Alda M.J., Barcelo D., 2008, Trace level determination of β -blockers in waste waters by highly selective molecularly imprinted polymers extraction followed by liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1189, 374–384.
- Hamid H., Eskicioglu C., 2012, Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Research* 46, 5813–5833.
- Han S., Wang Z., Huang H., Wang T., Zhou Z., Bai Y., Du P., Li X., 2022, Estimating antibiotics use in major cities in China through wastewater-based epidemiology. *Science of the Total Environment* 826, 154116.
- Harvey, R.A. & Cuculici, Gh.P., 2013, *Medicamente antiinflamatoare*. În: Harvey, R.A., Cuculici, Gh.P., Gheorghiu, A.W. (Eds.), *Lippincot Farmacologie Ilustrată*, editia a 5-a, Editura Medicală Callisto, București, pp. 525–548.
- Herrero P., Borrull F., Pocurull E., Marcé R.M., 2012, Determination of glucocorticoids in sewage and river waters by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1224, 19–26.
- Hilton M.J., Thomas K.V., 2003, Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1015(1-2), 129–141.
- Huynh N.C., Nguyen T.T.T., Nguyen D.T.C., Tran T.V., 2023, Occurrence, toxicity, impact and removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): A review. *Science of the Total Environment* 898, 165317.
- Iancu V.-I., Puiu D., Radu G.-L., 2020, Determination of some beta-blockers in surface water samples. *University Politehnica of Bucharest Scientific Bulletin, Series B* 82(2), 121–130.
- Iancu V.-I., Radu G.-L., Scutariu R., 2019, A new analytical method for the determination of beta-blockers and one metabolite in the influents and effluents of three urban wastewater treatment plants. *Analytical Methods* 11, 4668.

- Johnstone C., Hendry C., Farley A., McLafferty E., 2014, Endocrine system: part 1. *Nursing Standard* 28(38), 42–49.
- Jux U., Baginski R.M., Arnold H.-G., Krönke M., Seng P.N., 2002, Detection of pharmaceutical contaminations of river, pond, and tap water from Cologne (Germany) and surroundings. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 205(5), 393–398.
- Kankaanpää A., Ariniemi K., Heinonen M., Kuoppasalmi K., Gunnar T., 2014, Use of illicit stimulant drugs in Finland: A wastewater study in ten major cities. *Science of the Total Environment* 487, 696–702.
- Kannan A., Sims N., Hold A.J., Jagadeesan K., Standerwick R., Barden R., Kasprzyk-Hordern B., 2023, The burden of city's pain treatment – A longitudinal one year study of two cities via wastewater-based epidemiology. *Water Research* 229, 119391.
- Kasprzyk-Hordern B., Been F., Bijlsma L., Brack W., Castiglioni S., Covaci A., Martincigh B.S., Mueller J.F., van Nuijs A.L.N., Oluseyi T., Thomas K.V., 2023, Wastewater-based epidemiology for the assessment of population exposure to chemicals: The need for integration with human biomonitoring for global One Health actions. *Journal of Hazardous Materials* 450, 131009.
- Khumalo S.M., Makhathini T.P., Bwapwa J.K., Bakare B.F., Rathilal S., 2023, The occurrence and fate of antibiotics and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in water treatment processes: A review. *Journal of Hazardous Materials Advances* 10, 100330.
- Kock A., Glanville H.C., Law A.C., Stanton T., Carter L.J., Taylor J.C., 2023, Emerging challenges of the impacts of pharmaceuticals on aquatic ecosystems: A diatom perspective. *Science of the Total Environment* 878, 162939.
- Kołecka K., Gajewska M., Caban M., 2022, From the pills to environment – Prediction and tracking of non-steroidal anti-inflammatory drug concentrations in wastewater. *Science of the Total Environment* 825, 153611.
- Kummerer K., 2009, The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use—present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management* 90, 2354–2366.
- Lai F.Y., Bruno R., Leung H.W., Thai P.K., Ort C., Carter S., Thompson K., Lam P.K.S., Mueller J.F., 2013, Estimating daily and diurnal variations of illicit drug use in Hong Kong: A pilot study of using wastewater analysis in an Asian metropolitan city. *Forensic Science International* 233, 126–132.
- Lai F.Y., O'Brien J., Bruno R., Hall W., Prichard J., Kirkbride P., Gartner C., Thai P., Carter S., Lloyd B., Burns L., Mueller J., 2016, Spatial variations in the consumption of illicit stimulant drugs across Australia: A nationwide application of wastewater-based epidemiology. *Science of the Total Environment* 568, 810–818.
- Lai F.Y., Ort C., Gartner C., Carter S., Prichard J., Kirkbride P., Bruno R., Hall W., Eaglesham G., Mueller J.F., 2011, Refining the estimation of illicit drug consumptions from wastewater analysis: Co-analysis of prescription pharmaceuticals and uncertainty assessment. *Water Research* 45, 4437–4448.
- Lee H.-B., Sarafin K., Peart T.E., 2007, Determination of β -blockers and β 2-agonists in sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1148, 158–167.
- Lei H.-J., Yang B., Ye P., Yang Y.-Y., Zhao J.-L., Liu Y.-S., Xie L., Ying G.-G., 2021, Occurrence, fate and mass loading of benzodiazepines and their transformation products in eleven wastewater treatment plants in Guangdong province, China. *Science of the Total Environment* 755, 142648.

- Leong M.-I., Huang, S.-D., 2008, Dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 1211(1-2), 8–12.
- Li Z., Li J., Hu Y., Yan Y., Tang S., Ma R., Li L., 2024, Evaluation of pharmaceutical consumption between urban and suburban catchments in China by wastewater-based epidemiology. *Environmental Research* 250, 118544.
- Liu W., Yuan D., Han M., Huang J., Xie Y., 2021, Development and validation of a sensitive LC-MS/MS method for simultaneous quantification of thirteen steroid hormones in human serum and its application to the study of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 199, 114059.
- MacLeod S.L., Sudhir P., Wong C.S., 2007, Stereoisomer analysis of wastewater-derived β -blockers, selective serotonin re-uptake inhibitors, and salbutamol by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1170, 23–33.
- Maszkowska J., Stolte S., Kumirska J., Łukaszewicz P., Mioduszevska K., Puckowski A., Caban M., Wagil M., Stepnowski P., Białk-Bielińska A., 2014, Beta-blockers in the environment: Part II. Ecotoxicity study. *Science of the Total Environment* 493, 1122–1126.
- Moeder M., Schrader S., Winkler M., Popp, P., 2000, Solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry of biologically active substances in water samples. *Journal of Chromatography A* 873(1), 95–106.
- Moore N., Pollack C., Butkerait P., 2015, Adverse drug reactions and drug–drug interactions with over-the-counter NSAIDs. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 11, 1061–1075.
- Nguyen H.T., Thai P.K., Kaserzon S.L., O'Brien J.W., Eaglesham G., Mueller J.F., 2018, Assessment of drugs and personal care products biomarkers in the influent and effluent of two wastewater treatment plants in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Science of the Total Environment* 631–632, 469–475.
- Ofrydopoulou A., Nannou C., Evgenidou E., Christodoulou A., Lambropoulou D., 2022, Assessment of a wide array of organic micropollutants of emerging concern in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removals, mass loading and potential risks. *Science of the Total Environment* 802, 149860.
- Ojogoro J.O., Scrimshaw M.D., Sumpter J.P., 2021, Steroid hormones in the aquatic environment. *Science of the Total Environment* 792, 148306.
- Öllers S., Singer H.P., Fässler P., Müller S.R., 2001, Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. *Journal of Chromatography A* 911(2), 225–234.
- Parrilla Vázquez P., Martínez Galera M., Serrano Guirado A., Parrilla Vázquez M.M., 2010, Determination of five beta-blockers in wastewaters by coupled-column liquid chromatography and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 666, 38–44.
- Patel M., Kumar R., Kishor K., Mlsna T., Pittman Jr. Charles U., Mohan D., 2019, Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: chemistry, occurrence, effects, and removal methods. *Chemical Reviews* 119, 3510–3673.
- Poirier L., Tobe S.W., 2014, Contemporary use of beta-blockers: clinical relevance of subclassification. *Canadian Journal of Cardiology* 30, 9–15.
- Ramil M., El Aref T., Fink G., Scheurer M., Ternes T.A., 2010, Fate of beta blockers in aquatic-sediment systems: sorption and biotransformation. *Environmental Science and Technology*, 44, 962–970.
- Rastogi A., Tiwari M.K., Ghangrekar M.M., 2021, A review on environmental occurrence, toxicity and microbial degradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Journal of Environmental Management* 300, 113694.

- Rezaee M., Assadi Y., Milani Hosseini M.-R., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S., 2006, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography A* 1116, 1–9.
- Rice J., Kannan A.M., Castrignanò E., Jagadeesan K., Kasprzyk-Horderna B., 2020, Wastewater-based epidemiology combined with local prescription analysis as a tool for temporal monitoring of drugs trends - A UK perspective. *Science of the Total Environment* 735, 139433.
- Robards, K., Ryan, D., Jackson, P.E., 2004, *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, New York, Tokio, 500 p.
- Samadifar M., Yamini Y., Khataei M.M., Shirani M., 2023, Automated and semi-automated packed sorbent solid phase (micro) extraction methods for extraction of organic and inorganic pollutants. *Journal of Chromatography A* 1706, 464227.
- Samal K., Mahapatra S., Ali M.H., 2022, Pharmaceutical wastewater as Emerging Contaminants (EC): Treatment technologies, impact on environment and human health. *Energy Nexus* 6, 100076.
- Samavat H., Kurzer M.S., 2015, Estrogen metabolism and breast cancer, *Cancer Letters* 356, 231–243.
- Santana-Viera S., Lara-Martín P. A., Gonzalez-Mazo E., 2023, High resolution mass spectrometry (HRMS) determination of drugs in wastewater and wastewater based epidemiology in Cadiz Bay (Spain). *Journal of Environmental Management* 341, 118000.
- Sarvestani M.R.J., Madrakian T., Afkhami A. 2021, Developed electrochemical sensors for the determination of beta-blockers: A comprehensive review. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 899, 115666.
- Seidi S., Tajik M., Baharfar M., Rezazadeh M., 2019, Micro solid-phase extraction (pipette tip and spin column) and thin film solid-phase microextraction: Miniaturized concepts for chromatographic analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 118, 810–827.
- Skees A.J., Foppe K.S., Loganathan B., Subedi B., 2018, Contamination profiles, mass loadings, and sewage epidemiology of neuropsychiatric and illicit drugs in wastewater and river waters from a community in the Midwestern United States. *Science of the Total Environment* 631–632, 1457–1464.
- Tit D.M., Bungau S., Nistor-Cseppento C., Copolovici D.M., Buhas C., 2016, Disposal of unused medicines resulting from home treatment in Romania. *Journal of Environmental Protection and Ecology* 17(4), 1425–1433.
- Tomsone L.E., Perkons I., Sukajeva V., Neilands R., Kokina K., Bartkevics V., Pugajeva I., 2022, Consumption trends of pharmaceuticals and psychoactive drugs in Latvia determined by the analysis of wastewater. *Water Research* 221, 118800.
- Uzzaman M., Fatema K., Akhter S., Hossain R. Md., Akter N., Tasnuva S., Jahan S., Hasan K. Md., Shimu S. S. Mst., Hossain K. Md., Afrin F. Mst., 2023, Medicinal and toxicological investigation of some common NSAIDs; A computer-aided drug design approach. *Journal of Molecular Structure* 1292, 136124.
- van Nuijs A.L.N., Mougel J.-F., Tarcomnicu I., Bervoets L., Blust R., Jorens P.G., Neels H., Covaci A., 2011, Sewage epidemiology—A real-time approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium. *Environment International* 37, 612–621.
- Wang S., Green H.C., Wilder M.L., Du Q., Kmush B.L., Collins M.B., Larsend D.A., Zeng T., 2020, High-throughput wastewater analysis for substance use assessment in central New York during the COVID-19 pandemic. *Environmental Science Processes & Impacts* 22, 2147.

- OMS – Organizația Mondială a Sănătății, Who Model List of Essential Medicines – 22nd list, 2021. <<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2021.02>> [accesat 12.03.2025].
- Xu J., Sun H., Zhang Y., Alder A.C., 2019, Occurrence and enantiomer profiles of β -blockers in wastewater and a receiving water body and adjacent soil in Tianjin, China. *Science of the Total Environment* 650, 1122–1130.
- Xu, L. & Lee, H.K., 2012, *Sorbent-phase sample preparation in environmental analysis*. In: Pawliszyn J., Bayona J.M., Dugo P., Le X.C., Lee H.K., Li X-F., Lord H. (Eds.), *Comprehensive Sampling and Sample Preparation Analytical Techniques for Scientists*, Academic Press, pp. 541–567.
- Yan J., Lin W., Gao Z., Ren Y., 2021, Use of selected NSAIDs in Guangzhou and other cities in the world as identified by wastewater analysis. *Chemosphere* 279, 130529.
- Yi M., Sheng Q., Sui Q., Lu H., 2020, β -blockers in the environment: Distribution, transformation, and ecotoxicity. *Environmental Pollution* 266, 115269.
- Zhang Y., Duan L., Wang B., Du Y., Cagnetta G., Huang J., Blaney L., Yu G., 2019, Wastewater-based epidemiology in Beijing, China: Prevalence of antibiotic use in flu season and association of pharmaceuticals and personal care products with socioeconomic characteristics. *Environment International* 125, 152–160.
- Zhao J.-L., Ying G.-G., Wang L., Yang J.-F., Yang X.-B., Yang L.-H., Li X., 2009, Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography–negative chemical ionization–mass spectrometry. *Science of The Total Environment* 407(2), 962–974.
- Zuccato E., Chiabrando C., Castiglioni S., Calamari D., Bagnati R., Schiarea S., Fanelli R., 2005, Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environmental Health* 4, 14.

Anexa I.
Lista abrevierilor utilizate în mod frecvent în teza de doctorat

17-α-EE	17- α -Etinilestradiol
17-β-E	17- β -Estradiol
a	panta drepte de regresie
ACE	Acebutolol
ACN	Acetonitril
AF	Acid formic
AINS	Antiinflamatoare nesteroidiene
ATE	Atenolol
BIS	Bisoprolol
BOD	<i>Biological Oxygen Demand</i> consumul biologic de oxigen
BSTFA	<i>N,O-bis(Trimethylsilyl)TrifluoroAcetamide</i> N,O-bis(Trimetilsilil)TrifluorAcetamidă
BTX	Betaxolol
COD	<i>Chemical Oxygen Demand</i> consumul chimic de oxigen
DAD	<i>Diode Array Detector</i> detector cu șir de diode
DIC	Diclofenac
DLLME	<i>Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction</i> microextracția dispersivă lichid-lichid
DLLME-SFO	<i>Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction based on Solidification of Floating Organic Droplet</i> microextracție dispersivă lichid-lichid cu solidificarea solventului de extracție
E1	Estriol
E2	Estronă
EF	<i>Enrichment (preconcentration) Factor</i> factorul de preconcentrare
ER	<i>Relative Enrichment Recovery</i> gradul de recuperare relativă îmbogățită
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i> ionizare prin electropulverizare
GC-MS	<i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i> cromatografia în fază gazoasă cuplată cu spectrometria de masă

HC	<i>HydroCortisone</i> hidrocortizon
HLB	<i>Hydrophilic Lipophilic Balance</i> echilibru hidrofilic-lipofilic
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> cromatografia în fază lichidă de înaltă performanță
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> spectrometria de masă de înaltă rezoluție
HRT	<i>Hormone Replacement Therapy</i> terapie de substituție hormonală
IBU	Ibuprofen
ICH	<i>International Council for Harmonisation</i> Conferința Internațională pentru Armonizare
IT-MS	<i>Ion Trap Mass Spectrometer</i> spectrometru de masă cu trapă ionică
KET	Ketoprofen
K_{ow}	<i>n-Octanol-Water Partition Coefficient</i> coeficientul de partiție n-octanol-apă
LC	<i>Liquid Chromatography</i> cromatografia în fază lichidă
LD	<i>Limit of Detection</i> limita de detecție
LDM	<i>Limit of Detection of Method</i> limita de detecție a metodei
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> extracția lichid-lichid
loc	locuitori
LogP	<i>Logarithm of n-Octanol-Water Partition Coefficient</i> coeficientul de partiție
LQ	<i>Limit of Quantification</i> limita de cuantificare
LQM	<i>Limit of Quantification of Method</i> limita de cuantificare a metodei
m/z	<i>Mass-to-Charge Ratio</i> raportul masă/sarcină
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> monitorizarea reacțiilor multiple
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> spectrometrie de masă în tandem

MSTFA	<i>N-Methyl-N-Trimethylsilyl)triFluoroAcetamide</i> N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoracetamidă
MTP	Metoprolol
n	numărul de măsurători efectuate
n.d.	nedetectat
NAD	Nadolol
NAP	Naproxen
NH₄-N	Azot amoniacal
Orbitrap MS	<i>Orbitrap Mass Spectrometer</i> spectrometru de masă cu trapă orbitală
PARA	Paracetamol
PDA	<i>Photodiode Array Detector</i> detector cu fotodiode
PIN	Pindolol
pKa	constanta de aciditate
PRP	Propranolol
PTFE	<i>PolyTetraFluoroEthylene</i> politetrafluoroetilenă
PVDF	<i>PolyVinyliden Fluoride</i> difluorură de poliviniliden
QqLIT-MS	<i>Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry</i> spectrometria de masă cuadрупol cu trapă de ioni
QqQ-MS, TQ-MS	<i>Triple-Quadrupole Mass Spectrometry</i> spectrometria de masă cu triplu cuadрупol
QTOF-MS	<i>Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i> spectrometria de masă cu timp de zbor și cuadрупol
R²	<i>Correlation Coefficient</i> coeficientul de corelare
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> deviația standard relativă
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> coronavirusul sindromului respirator acut sever 2
SD	<i>Standard Deviation</i> deviația standard
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> monitorizarea ionului selectat
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i> extracția pe fază solidă

SUA	Statele Unite ale Americii
TMCS	<i>TriMethylChloroSilane</i> trimetilclorsilan
TN	azotul total
TP	fosforul total
t_R	<i>Retention Time</i> timpul de retenție
UHPLC	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i> cromatografia în fază lichidă de ultra-înaltă performanță
UPLC	<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i> cromatografia în fază lichidă ultra performanță
UV/Vis	<i>UltraViolet-Visible</i> ultraviolet-vizibil
WBE	<i>Wastewater Based Epidemiology</i> epidemiologia bazată pe ape uzate

Anexa II.
Lista publicațiilor științifice și a lucrărilor comunicate la
manifestări științifice pe baza cercetărilor realizate în cadrul
studiului doctoral

Publicații științifice:

M.-C. Herghelegiu, A. Ernault, M. S. Beldean-Galea, M.-V. Coman.

HPLC-PDA versus GC-MS in the analysis of paracetamol and non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewater.

Studia Universitatis Babes-Bolyai, Chemia 2023, 68(1), 19–35.

<https://doi.org/10.24193/subbchem.2023.1.02> (Impact factor: 0.500)

Beldean-Galea M.S., **Herghelegiu M.-C.**, Pănescu V.-A., Vial J., Bruzzoniti M.C., Coman M.-V.

The effectiveness of liquid-phase microextraction of beta-blockers from aqueous matrices for their analysis by chromatographic techniques.

Molecules 2025, 30, 1016.

<https://doi.org/10.3390/molecules30051016> (Impact factor: 4.2)

M.-C. Herghelegiu, M.-V. Coman, M.S. Beldean-Galea.

A pilot study for evaluation of steroid hormone consumption in Cluj-Napoca, Romania, through wastewater-based epidemiology –

Toxicological and Environmental Chemistry – acceptată spre publicare (06.07.2025).

M.S. Beldean-Galea, **M.-C. Herghelegiu**, A. Combès, J. Vial, R. Tötös, M.C. Bruzzoniti, M.-V. Coman.

A surveillance of paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drug consumption in Cluj-Napoca, Romania using wastewater-based epidemiology –

Metabolites – în pregătire finală (abstract acceptat spre publicare).

Lucrări comunicate la manifestări științifice

26th International Symposium on Separation Sciences, 28/06–01/07/2022, Ljubljana, Slovenia.

Poster: Analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol in wastewater by GC-MS and HPLC-PDA. A comparative study.

***M. C. Herghelegiu**, M.-V. Coman, M.S. Beldean-Galea

51th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 18–22/06/2023, Duesseldorf, Germania.

Poster: Estimating the consumption of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol in the SARS-CoV-2 pandemic in Romania through wastewater-based epidemiology.

***M.-C. Herghelegiu**, A. Combes, M.-V. Coman, M.S. Beldean-Galea

27th International Symposium on Separation Sciences, 24–27/09/2023, Cluj-Napoca, Romania.

Poster: A pilot study for evaluation of steroid hormone consumption in Cluj-Napoca, Romania through wastewater based epidemiology

***M.-C. Herghelegiu**, M.-V. Coman, M.S. Beldean-Galea

Poster: Wastewater-Based Epidemiology as a surveillance tool to assess human consumption of beta-blockers

M.-C. Herghelegiu, E. Ea, V.-A. Pănescu, M.-V. Coman, M.S. Beldean-Galea

Symposium Environment & Progress 13/06/2024 – 15/06/2024, Cluj-Napoca, România.

Prezentare orală: Wastewater-based epidemiology as a monitoring tool for assessing human consumption of pharmaceuticals

***M.-C. Herghelegiu**, M.-V. Coman, M. S. Beldean-Galea

28th International Symposium on Separation Sciences, 22–25/09/2024 Messina, Italia.

Prezentare orală: Wastewater-based epidemiology to assess pharmaceutical consumption in urban populations

M.-V. Coman, **M.-C. Herghelegiu**, M. S. Beldean-Galea

Prezentare orală: The effectiveness of liquid phase microextraction of betablockers from aqueous matrices for their analysis by chromatographic techniques

M.-C. Herghelegiu, V. A. Pănescu, M.-V. Coman, M. S. Beldean-Galea

*Lucrări comunicate personal

Anexa III

Stagii de cercetare desfășurate în străinătate în cadrul programului doctoral

Stagiul doctoral de cercetare efectuat la:

École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de Paris

(ESPCI Paris-PSL), Paris, Franța,

Department of Analytical Chemistry,

Laboratory of Analytical, Bioanalytical Sciences and Miniaturization (LSABM).

Perioada: 13 septembrie 2022 – 11 noiembrie 2022

Lucrări experimentale efectuate utilizând infrastructura de cercetare a laboratorului:

Extracția SPE pe cartușe Strata-X și analiza LC-MS/MS a paracetamolului și a patru antiinflamatoare nesteroidiene (ketoprofen, naproxen, ibuprofen și diclofenac) din probe de ape uzate, prelevate de la Stația de Epurare din municipiul Cluj-Napoca, în două campanii (septembrie 2021 și februarie 2022). Elaborarea și validarea metodei de analiză LC-MS/MS. Utilizarea metodei la determinarea concentrațiilor medicamentelor studiate. Interpretarea rezultatelor experimentale obținute.