

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"CAROL DAVILA" - BUCUREȘTI
FACULTATEA DE FARMACIE**

TEZĂ DE DOCTORAT

Rezumat

**Principii active vegetale cu eventuale proprietăți de antidot
în intoxicațiile cu metale grele**

**Conducător științific
Prof. univ. dr. Viorica ISTUDOR**

**Doctorand
Șef lucrări farm. Florentina Nicoleta RONCEA**

INTRODUCERE

Analizând evoluția îmbolnăvirilor profesionale în ultimii 11 ani (1992-2002), constatăm o creștere evidentă a acestor cazuri în perioada 1992-1997, iar intoxicațiile profesionale ocupă locul secund în structura pe cauze a noilor cazuri de îmbolnăvire în România. Nu în ultimul rând date recent publicate (sept. 2006) în literatura de specialitate menționează prevalența intoxicației neprofesionale cu acetat de plumb, respectiv s-au identificat ca surse ale acestora plante utilizate în medicina tradițională indiană, ayurvedică.

Întrucât intoxicația neprofesională cu compușii anorganici ai plumbului produce hematotoxicitate (inhibarea enzimelor tiolofoare cu blocarea lanțului porfirinic și interferarea biosintezei hemului, creșterea concentrației acidului δ -aminolevulinic în ser, eliminarea crescută în urină scăderea hemoglobinei și a numărului eritrocitelor, alterarea membranei eritrocitare) și nefrotoxicitate (manifestată la nivelul tubilor contorți proximali și distali), iar antidoturile utilizate manifestă nespecificitate și efecte toxice (nefrotoxicitate, depleția ionilor de Ca^{2+} , Zn^{2+} , efecte cutanate), ne-am orientat către alte substanțe chelatoare – liganzi naturali (quercetolul, rutozida), care să prezinte mai puține efecte toxice și să acționeze ca antidot. În acest sens cercetările au demarat cu demonstrarea capacității chelatante *in vitro* a liganzilor naturali (rutozida și quercetolul), urmată de obținerea complexilor prin semisinteză. Dovedită fiind aserțiune, ne-am orientat determinările spre verificarea acțiunii quercetolului *in vivo* asupra crustaceelor, moluștelor intoxicate cu acetat de plumb și tratate cu quercetol cu evidențierea modificărilor asupra unor parametri fiziologici, a enzimelor de stres implicate (SOD, catalaza), a concentrației ionilor de plumb.

Cercetările experimentale pe șoareci referitoare la rolul de antidot al quercetolului au demonstrat existența unui raport de bioinactivare acetat de plumb/quercetol de 2,18 și un indice de protecție 1,43. Aceste rezultate ne-au permis abordarea unor cercetări mai ample în vederea obținerii unui extract flavonozidic standardizat în quercetol – respectiv selectarea produsului vegetal *Sophorae flores*, stabilirea procesului tehnologic de obținere a extractului, optimizarea lui prin metode informatice (tehnica suprafețelor de răspuns), elaborarea metodologiei de control al calității, caracterizare organoleptică, pH-ul soluției, reacții de identificare specifice, analiză spectrală în UV-VIS și profil cromatografic, determinarea conținutului în flavone și standardizare (5,19 g% în quercetol, cu un conținut în polifenoli și o capacitate antioxidantă crescută).

Studiile preliminare au permis prelucrarea extractului flavonozidic selectiv din *Sophorae flores* într-o formă farmaceutică perorală, reprezentată de comprimatele neacoperite. Acestea au fost formulate și caracterizate din punct de vedere al calității standardelor în vigoare.

În elaborarea acestei lucrări m-am bucurat de colaborarea unor specialiști cu calități profesionale și umane de excepție, cărora doresc să le mulțumesc.

Am avut șansa să întâlnesc în doamna profesor universitar dr. farm. Viorica Istudor, un **ARISTOS**, care n-are nevoie de uniformă, de simboluri, deoarece ideile sunt uniforma sa, acțiunile îi sunt simbolurile, știe că diferența dintre domnia sa și cei mulți nu poate fi dată de origine, bogăție, putere. Ea se poate baza numai pe bunătate, inteligent pusă în practică. Domnia sa mi-a indus ideea că în acest univers al oglinzilor și metaforelor, omul reflectă toate realitățile și se raportează la toate, că orice minte le conține pe toate, dar ascunse. Procesul infinit devine finit în fiecare lucru în parte, orice lucru este o secțiune transversală prin eternitate.

Mulțumiri domnului profesor universitar dr. farm. Gheorghe Țărlungă, prodecanul Facultății de Medicină Dentară și Farmacie din cadrul Universității "Ovidius" Constanța, șeful disciplinei de Farmacologie și coordonatorul colectivului de la Centrul de Cercetări Științifice Medico-Militare București, pentru profesionalismul și amabilitatea dovedite la realizarea cercetărilor farmacologice și sprijinul necondiționat acordat.

Sunt recunoscătoare doamnei profesor univ. dr. farm. Victoria Hîrjău, de la disciplina de Tehnică farmaceutică, din cadrul Facultății de Farmacie a Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila", București pentru sfaturile și îndrumările care mi-au fost oferite cu eleganța competenței profesionale în alegerea formulării optime pentru comprimatelor farmaceutice neacoperite.

Mulțumesc domnișoarei prof. univ. dr. Mihaela Mirela Bratu pentru abnegația și bunăvoința manifestate la realizarea tuturor determinărilor biologice.

Adresez mulțumiri doamnei profesor univ.dr. Veronica Nacea, doamnei conferențiar univ. dr. Valentina Uivarosî de la disciplina de Chimie anorganică din cadrul Facultății de Farmacie a Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila", București pentru inițierea mea în obținerea complexilor.

Ulterior am continuat colaborarea cu doamna conferențiar univ. dr. Constanța Sava de la disciplina de Chimie analitică din cadrul cadrul Universității "Ovidius" Constanța, Facultatea de Farmacie căreia îi mulțumesc.

Apreciez bunăvoința colectivului coordonat de domnul profesor univ. dr. Dumitru Coprean, de la Facultatea de Biologie, din cadrul Universității "Ovidius" Constanța pentru accesul în biobaza facultății.

Salut colectivul de la Universitatea Politehnică București, Facultatea de Chimie, și mulțumesc doamnei dr. Maria Giurgincă și doamnei conf. univ. dr. Ticuța Negreanu Pîrjol din cadrul Facultății de Medicină Dentară și Farmacie, a Universității "Ovidius" Constanța, specializarea Farmacie, disciplina de chimie anorganică, care prin amabilitate și bunăvoință au realizat și interpretat spectrele FT-IR, UV-VIS -NIR pentru complexii sintetizați în laboratoarele Facultății de Farmacie din Constanța.

Mulțumesc doamnei conf. univ. dr. Mariana Arcuș (Facultatea de Medicină Dentară și Farmacie, a Universității "Ovidius" Constanța, specializarea Farmacie) și doamnei conf. univ. dr. Elena Doroftei (Universitatea

"Ovidius", Constanța, Facultatea de Biologie) pentru sprijinul oferit în stabilirea acțiunii complexului studiat asupra diviziunii celulei vegetale.

Întrucât o mare parte din experiențele realizate au necesitat material biologic, reprezentat de crustacei și moluște, doresc să mulțumesc din nou pentru sprijinul acordat necondiționat în procurarea și utilizarea lor, domnului șef lucrări dr. Mircea Crâșmaru, de la Institutul de Cercetări Marine "Gr. Antipa" Constanța.

Considerație, prețuire și prietenie adresez colectivului disciplinei de Farmacognozie. Fitochimie - Fitoterapie, (șef lucrări drd. Laura Bucur, asistent univ. drd. Antoanela Popescu) din cadrul Facultății de Farmacie, Universitatea "Ovidius" Constanța, pentru sprijinul acordat oricărei solicitări.

Nu în ultimul rând, doresc să mulțumesc colectivului din compartimentul Cercetare – Dezvoltare al fabricii Magistra C&C, coordonat de domnul asistent univ. drd. Radu George Cazacincu, care a răspuns cu sollicitudine în demersul meu de a realiza comprimate neacoperite cu extract din *Sophorae flores*.

Gratitudine pentru sugestiile privind tehnoredactarea lucrării și redactarea unor structuri chimice adresez domnului dr. ing. Bogdan Istudor.

Mulțumesc tuturor cadrelor didactice care au contribuit la formarea mea profesională.

Mulțumesc celor dragi (prieteni, familie) care au știut și acceptat limitele libertății proprii, responsabilizarea acesteia, conștientizarea propriilor mele puteri.

Lucrarea are 196 pagini, 102 tabele, 112 figuri, 410 de referințe bibliografice (inserate la sfârșitul fiecărui capitol) și este structurată în 12 capitole.

Primele două capitole constituie partea teoretică, iar capitolele 3 - 10 partea experimentală. Capitolul 11 cuprinde rezultatele și discuțiile generale, iar capitolul 12 concluziile acestei teze de doctorat.

Pentru prezentarea datelor din literatura de specialitate care au fundamentat acest studiu și a rezultatelor cercetărilor personale, am utilizat următorul plan de redactare:

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ

CAPITOLUL 1. Generalități privind intoxicația cu plumb	1
1.1. Surse ale intoxicației profesionale cu plumb	1
1.2. Surse ale intoxicației neprofesionale cu plumb	2
1.3. Căi de pătrundere în organism	3
1.4. Toxicocinetica intoxicației cu plumb	3
1.4.1. Absorbția compușilor plumbului	4
1.4.2. Distribuția	6
1.4.3. Metabolizarea compușilor plumbului	7
1.4.4. Eliminarea	8
1.4.5. Toxodinamia intoxicației cu plumb - Mecanism de acțiune	8
1.5. Consecințe biologice ale intoxicației cu plumb	9
1.6. Tabloul clinic al intoxicației cu plumb	14
1.7. Biomarkeri ai intoxicației cu plumb și influența asupra testelor de laborator.	15
1.7.1. Criterii pentru suspiciunea de boală profesională	15
1.7.2. Influența asupra testelor de laborator	16
1.8. Terapia intoxicației cu plumb	16
1.8.1. Agenți de chelatare convenționali	18
1.8.1.1. EDTANa ₂ Ca	18
1.8.1.2. DTPA	19
1.8.2. Agenți de chelatare care conțin grupări –SH sau S-S în structură	19
1.8.2.1. Dimercaprol (BAL, British Anti – Lewisite)	19
1.8.2.2. DMSA (Succimer)	21
1.8.2.3. DMPS (Unithiol)	23
1.8.2.4. Penicilamina	23
1.8.3. Antagoniști naturali	24
1.8.3.1. Scavengeri ai toxicității - micronutrienții	24

1.8.3.2. Scavengeri ai toxicității - antioxidanții	25
1.8.4. Terapii asociate utilizate în chelatarea plumbului	27
1.8.5. Efectul protector al compușilor naturali și a extractelor vegetale asupra intoxicației induse de plumb	27
CAPITOLUL 2. Principii active de natură vegetală cu proprietăți chelatoare	30
2.1. Criterii de selecție a unui antidot de origine vegetală	30
2.2. Flavonoide	30
2.2.1. Flavonozide – structură chimică și proprietăți	32
2.2.2. Corelații între structura chimică, proprietățile fizico-chimice și acțiunea farmacologică	33
2.2.3. Quercetolul – exponent reprezentativ ai flavonoidelor	37

PARTEA EXPERIMENTALĂ

CAPITOLUL 3. Verificarea <i>in vitro</i> a capacității de complexare a rutozidei și quercetolului	41
3.1. Determinarea raportului de combinare	42
3.2. Determinarea constantei de instabilitate a complexului	45
3.3. Obținerea complexelor prin semisinteză	47
3.4. Influența complexului quercetol – plumb (Qcomplex) asupra fiziologiei celulei vegetale în scopul determinării eventualelor fenomene toxice - Testarea fitobiologică prin metoda Constantinescu	54
CAPITOLUL 4. Cercetări privind efectul antitoxic al quercetolului și al rutozidei la crustacei și moluște intoxicate cu săruri de plumb sau cadmiu	71
4.1. Efectul <i>in vivo</i> al rutozidei asupra speciei <i>Euxinia maeotica</i> intoxicată cu CdCl ₂	71
4.1.1. Influența asupra parametrilor fiziologici	71
4.1.2. Determinarea proteinelor solubile	73
4.1.3. Influența rutozidei asupra activității SOD	76
4.1.4. Aprecierea ratei viabilității	78
4.2. Acțiunea <i>in vivo</i> a quercetolului asupra moluștei <i>Mytilus galloprovincialis</i> intoxicată cu acetat de plumb	80
4.2.1. Influența asupra parametrilor fiziologici	80

4.2.2. Determinarea conținutului în proteine totale	82
4.2.3. Determinarea activității SOD	83
4.2.4. Determinarea activității catalazei	85
4.2.5. Determinarea concentrației de Pb^{2+} din <i>Mytilus galloprovincialis</i> intoxicate și tratate	89
CAPITOLUL 5. Efectul quercetolului asupra șoarecilor intoxicați cu acetat de plumb	92
5.1. Evaluarea efectului antidotic al quercetolului	92
5. 2. Evaluarea reducerii efectului toxic al acetatului de plumb în prezența quercetolului	100
5.2.1. Determinarea δ - ALA (acid δ -aminolevulinic) în urină	102
5.2.2. Determinarea concentrației de plumb în urină	108
5.2.3. Determinarea hemoglobinei în sânge (metoda Drabkin)	109
5.2.4. Examenul histopatologic	110
5.2.5. Determinarea enzimelor de stres (SOD, catalaza)	113
CAPITOLUL 6. Obținerea unui extract flavonozidic selectiv	115
6.1. Alegerea sursei de derivați derivați flavonici (rutozidă și quercetol)	115
6.2. Obținerea materiilor prime	116
6.2.1. Recoltarea și uscarea florilor speciei <i>Sophora japonica</i> L.	116
6. 2. 2. Verificarea identității și determinarea calității produsului vegetal	117
6.2.3. Separarea și identificarea flavonozidelor prin CSS	119
6.2.4. Determinarea calității produsului vegetal	121
6.2.4.1. Determinarea pierderii prin uscare	121
6.2.4.2. Determinarea substanțelor solubile	122
6.2.4.3. Dozarea flavonelor	123
6.3. Stabilirea unui procedeu tehnologic de obținere a extractului flavonozidic	126
6.3.1. Stabilirea solventului de extracție	127
6.3.2. Alegerea procedurii de extracție	128
6.3.3. Determinarea condițiilor optime de extracție (raport produs/solvent, grad de mărunțire, timp de extracție, temperatura de extracție).	128
6.3.4. Obținerea soluției extractive	128
CAPITOLUL 7. Elaborarea metodologiei de control al calității extractului flavonozidic selectiv	132
7.1. Determinarea parametrilor înscrși în F.R.X.	132

7.2. Identificarea principiilor active prin reacții chimice specifice	133
Analiza spectrală UV – VIS utilizată la identificarea flavonelor	135
7.3. Determinări cantitative	137
7.3.1. Determinarea pierderii prin uscare	137
7.3. 2. Dozarea flavonelor din extractul flavonozidic	138
7.3.3. Determinarea conținutului în polifenoli totali	140
7.3.4. Determinarea capacității antioxidante a extractelor flavonozidice	142
7.3.5. Stabilirea corelației între polifenolii totali și capacitatea antioxidantă prin analiza de corelație și regresie	147
7.3.6. Determinarea toxicității acute a extractelor flavonozidice selective	149
CAPITOLUL 8. Cercetări privind standardizarea, validarea și optimizarea procesului tehnologic de obținere a unui extract flavonozidic selectiv prin metodologia suprafeței de răspuns, precum și perioada de stabilitate (valabilitate) a extractului	151
8.1. Standardizarea extractului flavonozidic selectiv	151
8.2. Optimizarea	151
8.3. Selecționarea tipurilor de variabile	152
8.3.1. Determinarea coeficienților ecuațiilor de răspuns	156
8.4. Selectarea formulei optime	159
8.5. Cercetări privind validarea procesului tehnologic de laborator	161
CAPITOLUL 9. Cercetări preliminare privind obținerea unui produs farmaceutic pe bază de extract flavonozidic selectiv	162
9.1. Formularea și prepararea comprimatelor	163
9.2. Proprietățile reologice ale pulberii	167
9.2.1. Determinarea volumului aparent	168
9.2.2. Curgerea pulberilor	168
9.3. Obținerea comprimatelor – Comprimarea directă	170
CAPITOLUL 10. Elaborarea metodologiei de control al calității comprimatelor convenționale cu extract de <i>Sophorae</i> 100 mg/comprimat	172
CAPITOLUL 11. Rezultate și discuții generale	179
CAPITOLUL 12. Concluzii generale	192
Bibliografie	195
Anexa I	216

PARTEA TEORETICĂ

Capitolul 1. Generalități privind intoxicația cu plumb

Sursele intoxicației profesionale cu plumb pot fi: minele de plumb și de zinc (în sud-vestul și nordul țării noastre sau zone puternic industrializate, cum ar fi Iași și mai ales sudul Moldovei [1 - 15], industria construcțiilor, fabricile de acumulatori și de vopsele, tipografiile, insecticidele pe bază de arseniat de plumb, fabricarea și utilizarea ca detonanți în benzine a unor compuși organici volatili (plumb tetraetil).

Sursele intoxicației neprofesionale cu plumb se referă la ingestia de băuturi și alimente conservate în ambalaje metalice sau a celor care conțin pesticide cu plumb, la saturnismul de origine hidrică întâlnit la utilizarea țevelor din plumb pentru transportul apei potabile, în regiunile în care apa este săracă în calcar, prezența în mediul înconjurător (sol, apă), afectează atât stadiile de dezvoltare ale florei și faunei (menționăm efectul cumulativ al Pb și Cd în lanțul trofic al ecosistemelor), cât și sănătatea umană [7].

1. 4. Toxicocinetica intoxicației cu plumb

Etapile toxicocineticii compușilor plumbului (absorbția, distribuția, metabolizarea și excreția) au fost studiate *in vivo* pe animale de laborator. Cu toate acestea, o serie de mecanisme ale proceselor farmacocinetice nu sunt cunoscute, deoarece absorbția plumbului este influențată de o serie de factori : modul de expunere, specia chimică, proprietățile fizico-chimice ale compusului, starea fiziologică (concentrația serică de calciu și de fier din organism) și vârsta individului expus [9-12].

Cea mai frecventă este absorbția pe cale orală, gastrointestinală a plumbului este influențată atât de starea fiziologică a pacientului expus (vârstă, nivelul calciului și al fierului seric), prezența fosfaților în dietă, cât și de proprietățile fizico-chimice ale compusului ingerat, dar nu este influențată de proveniența acestuia (praf, mizerie, dietă). După absorbție, plumbul este transportat sub formă de fosfat coloidal, legat de albumine și γ -globuline și fixat în stroma globulară eritocitară. Distribuția plumbului se realizează tricompartimental, respectiv în compartimentul sanguin, țesuturi moi și oase. La nivelul sângelui Pb^{2+} se distribuie inițial în hematii unde este legat în mai mare măsură în interiorul celulei decât de membrana eritocitară. (99%) cu un timp de înjumătățire de 36 de zile.

Ionii de Pb^{2+} ai compușilor anorganici nu sunt metabolizați în organism, ci formează complecși cu o serie de liganzi (proteine sau alte molecule). Eliminarea se produce pe cale renală, prin filtrare sau secreție tubulară, fiind principala cale de excreție (75%), cu importanță de diagnostic și terapeutică; căile secundare sunt fanerele (păr, unghii) transpirația, calea digestivă (prin fecale, bilă).

1.4.5. Toxodinamia intoxicației cu plumb

Plumbul și compușii săi anorganici manifestă *hematotoxicitate, neurotoxicitate, vasculotoxicitate și nefrotoxicitate*.

Hematotoxicitatea : prin inhibarea enzimelor tiolofore Pb^{2+} blochează lanțul porfirinic și interferează de asemenea în biosinteza globinei. Consecința o reprezintă creșterea δ -ALA, a fierului în ser, a protoporfirinelor în eritrocite, a porfirinelor în urină și scăderea hemoglobinei și a eritrocitelor (anemie saturnică). Pb^{2+} alterează și membrana eritocitară prin acțiune toxică directă asupra lipoproteinelor din structura ei și prin inhibarea ATP-azei. Rezultă creșterea fragilității eritrocitelor, scăderea duratei medii de viață a acestora, ceea ce favorizează hemoliza intravasculară și creșterea corespunzătoare a reticulocitelor. Hemoliza constă în lezarea fizică sau chimică a membranelor hematilor prin mecanism oxidativ [16 - 29].

Neurotoxicitatea : la nivelul S.N.C. acțiunea toxică se exprimă prin encefalopatie saturnică. La nivelul nervilor periferici Pb^{2+} determină degenerarea mielinei din structura axonilor, cu apariția nevritei motorii.

Vasculotoxicitatea: acțiunea toxică asupra vaselor se manifestă prin spasme, hemoragii perivasculare, creșterea permeabilității vasculare, edem cerebral.

Nefrotoxicitatea: la nivelul tubilor contorți proximali tulburările sunt consecința inhibării dehidrogenazei mitocondriale și a degradării acidului piruvic.

1. 6. Tabloul clinic al intoxicației cu plumb

Formele clinice ale intoxicației cu plumb sunt: intoxicația acută cu plumb anorganic sau cu compuși organici, intoxicația cronică sau saturnismul cronic la care simptomatologia clinică variază în raport cu nivelul plumbului în organism.

Intoxicația acută cu plumb elementar și săruri anorganice de plumb survine în urma ingestiei accidentale a unei sări solubile de plumb (acetat, carbonat și cromat), apar simptome și semne de durere abdominală colicativă, constipație, artralгии, slăbiciune musculară, stare depresivă.

În cazuri rare, inhalarea de particule fine de oxid de plumb, în cantități mari, produce manifestări de intoxicație acută, caracterizate prin, sete, gust metalic, grețuri, vărsături și colică intestinală, care pot fi urmate rapid de fenomene neurologice centrale. Uneori se produc crize hemolitice, cu hemoglobinurie, insuficiență renală acută [18 - 35]. Anemia, la doze mari de plumb, este uzual hemolitică.

La nivelul SN periferic, plumbul produce o neuropatie motorie clasică. Slăbiciunea motorie este manifestată mai ales la nivelul extensorilor (căderea pumnului) [100 - 132].

1.8. Tratamentul intoxicației acute cu plumb și compuși săi

Terapia cu chelați este recomandată atunci când Pb^{2+} atinge concentrații sanguine mai mari decât 50 $\mu g/dL$ [98]. În acest scop se folosesc mai multe antidoturi ale căror structuri chimice sunt redată în figura 2. Antidoturile utilizate în terapia intoxicației profesionale și neprofesionale cu plumb pot fi clasificați pe baza mai multor criterii (structură chimică, antagonism, scavengeri ai toxicității, antioxidanți), astfel:

- ▼ agenți de chelatare convenționali;
- ▼ agenți de chelatare care conțin grupări – SH sau – S-S în structură;
- ▼ antagoniști naturali - Scavengeri ai toxicității – micronutrienții;
- ▼ antagoniști naturali - Scavengeri ai toxicității – antioxidanții.

Capitolul 2. Principii active de natură vegetală cu proprietăți chelatante

Din cele relatate la terapia intoxicației cu plumb reiese că majoritatea antidoturilor folosite în acest scop sunt liganzi ai plumbului, cu un grad mare de toxicitate (**hepatotoxicitate, hematotoxicitate, nefro-, vasculo- și neurotoxicitate**).

De aceea ne-am orientat către alți liganzi, căutând printre compuși naturali, liganzi (flavonoide, aminoacizi) presupuși a fi lipsiți de toxicitate și cu reacții adverse reduse și care corespund criteriilor de selecție a unui antidot de origine vegetală. Întrucât grupul este foarte divers ca structură chimică și proprietăți, ne-am oprit asupra flavonozidelor. Alegerea lor s-a bazat pe structura chimică, proprietățile fizico-chimice, farmacologice și biologice, cât și de accesibilitatea sursei [1 - 7].

Flavonoidele, prin caracterul reducător al grupărilor –OH fenolice, dar și prin proprietatea de a chelata metalele bi și trivalente (Mg^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Sb^{3+}), manifestă proprietăți antioxidante. Flavonoidele protejează țesuturile împotriva speciilor de radicali liberi de oxigen (RLO), în special a radicalilor superoxid (RSO) și a peroxidării lipidice membranare. Elementele structurale necesare manifestării de acțiune protectoare față de RSO pentru flavonoide se referă la: prezența grupării OH libere în poziția 3 a nucleului benzopiranic, dublă legătură între carbonii 2-3; grupări –OH fenolice pe fenilul de la C-2 în "**orto**", respectiv la C-3' și C-4' și liposolubilitate.

Datorită proprietăților chimice de a forma chelați, solubili, a particularităților farmacocinetice și a acestor acțiuni farmacologice care au fost observate *in vitro* sau *in vivo* quercetolul ar putea interveni în rezolvarea efectelor toxodinamice pe care le produce intoxicația cu plumb, prin eliminarea Pb^{2+} sub forma unor chelați solubili și intervenind asupra **hematotoxicității, vasculotoxicității, nefrotoxicității**, eventual a **neurotoxicității**, prin acțiune antioxidantă - de **scavenger** (captator) al radicalilor liberi, precum și asupra tratamentului simptomatic care vizează tratarea colicilor, a fragilității vasculare care conduce la hemoragii perivasculare. Pornind de la datele de farmacocinetică ale derivaților flavonici menționate, evidențiam selectiv cele

mai reprezentative acțiuni farmacodinamice ale quercetolului care ar putea interveni în anihilarea acțiunii toxice a ionilor de plumb asupra organismului uman.

Astfel quercetolul prezintă **proprietăți antioxidante** conferind protecție față de stresul oxidativ indus de glutamat, de peroxidul de hidrogen și de alte forme de stres (hipoglicemie), acționează sinergic cu unele vitamine (C, E) și carotenoide.

Crește rezistența capilară și membranară, scade permeabilitatea și astfel exercită o **acțiune vasculoprotectoare asupra membranei eritrocitare** și a trombocitelor protejându-le de alterarea oxidativă indusă de RLO și scade afinitatea trombocitelor față de leziuni [42].

Acțiunea neuroprotectoare constă în protejarea celulelor neuronale (*in vitro* și *in vivo*) contra agresiunii stresului oxidativ prin creșterea nivelului intracelular de glutation, redus, prin împiedicarea deschiderii canalelor de Ca^{2+} și a pătrunderii acestor ioni în interiorul celulei evitând astfel moartea celulară.

Prezintă acțiune spasmolitică *in vitro* și *in vivo* cu valoare a intensității de acțiune (comparativ cu papaverina luată ca etalon), egală cu 0,72, inhibă contracțiile intestinale induse de diferite concentrații de Ca^{2+} .

La nivel renal *in vivo* s-a constatat că prezintă efect protector sugerând încorporarea quercetolului în straturile membranei lipidice și interferarea în peroxidarea membranei lipidice.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

Capitolul 3. Verificarea *in vitro* a capacității de complexare a rutozidei și a quercetolului

Ipoteza cercetărilor noastre se bazează pe proprietățile flavonoidelor de chelatare a unor metale plurivalent, de inhibare a unor enzime, între care unele sunt implicate în procesul stresului oxidativ (peroxidaza, catalaza, superoxidodismutaza, xantioxidaza) și pe proprietățile antioxidante.

De aceea am considerat necesar să demonstrăm că aceste fenomene se produc atât "*in vitro*" cât și "*in vivo*". Deoarece în desfășurarea cercetărilor noastre am plecat de la ipoteza conform căreia flavonozidele ar putea constitui un antidot în intoxicațiile cu Pb și cu alte metale grele, prin formarea unor complecși care pot fi eliminați prin urină, cum era și firesc, am considerat necesar să verificăm considerentele pe care ne-am bazat.

• **Material și metodă**

În acest sens se folosesc soluții izomolare de acetat de plumb (M), soluție apoasă și de quercetol (L) soluție metanolică, cu concentrații cuprinse în intervalul (2×10^{-4} – 4×10^{-4} M, 2×10^{-5} – 4×10^{-5} M și 2×10^{-6} – 4×10^{-6} M) care se amestecă în volume diferite și se aduc la volum final constant. Cu fiecare din aceste serii de soluții izomolare se prepară diferite amestecuri.

Probele obținute se omogenizează prin agitare și se lasă în contact 45 de minute, după care se determină absorbanta la $\lambda = 435 \text{ nm}$ și se trasează curba Job, $A = f(x)$. Din intersecția tangentelor la curbă, care pornesc din valorile $x=0$ și $x=1$, se deduce valoarea lui x_{maxim} , respectiv raportul de combinare q/p .

Pentru determinarea constantei de stabilitate a complexului s-a preparat o serie de amestecuri de soluții neizomolare o serie de amestecuri de soluții neizomolare de quercetol $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ (soluție metanolică) și acetat de plumb, $4 \times 10^{-6} \text{ M}$, după algoritmul prezentat la determinarea raportului de combinare. Din raportul celor două concentrații se determină q . Se trasează curba $A=f(x)$, la aceeași lungime de undă, $\lambda=435 \text{ nm}$ și se calculează constanta de instabilitate a complexului.

Semisinteza complexșilor s-a realizat folosind ca liganzi, rutin $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ și quercetol $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, de proveniență Merck, iar ca agenți complexanți acetatul de $\text{Pb} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ și $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Ca solvent pentru cei doi liganzi am folosit metanol absolut. Pentru realizarea domeniului de pH (4,5-5,5) am utilizat acetat de sodiu anhidru p.a., iar pentru determinarea raportului molar optim de combinare am utilizat două rapoarte molare (1/2,5 și 1/5) și doi cationi (Pb^{2+} și Cd^{2+}).

Pentru determinarea rapoartelor molare am avut în vedere faptul că în mediu neutru pentru un cation de Pb^{2+} sau Cd^{2+} sunt necesari 2 moli de quercetol sau rutozidă, un pH aproape neutru (pentru complexii „orto” sau „para”) sau $\text{pH}>7$ pentru complexi „peri”. Plecând de la ideea că un intoxicat are întotdeauna exces de ioni toxici, am experimentat combinațiile 1 mol ligand la 2,5 și 5 moli ion chelatant. În acest scop am folosit mai multe concentrații de rutin, quercetol, acetat de plumb, acetat de cadmiu.

a) Pentru raportul molar rutin:acetat de Pb, 1:2,5, am cântărit 1,392 g rutin și 1,8967 g acetat de Pb pe care le-am dizolvat în 100 ml metanol absolut, am adăugat 0,01 g acetat de sodiu. Amestecul obținut a fost refluxat pe baia de apă la 80°C , timp de 2 ore. Se observă apariția unui precipitat roșu –cărămiziu.

b) În cazul raportului molar rutin:acetat de Pb, 1:5, pentru aceasta am cântărit 0,13292 g rutin și 3,79 g acetat de Pb pe care le-am dizolvat în 100 ml metanol absolut, am adăugat 0,01 g acetat de sodiu. Amestecul obținut a fost refluxat pe baia de apă la 80°C , timp de 2 ore. Se observă apariția unui precipitat roșu –cărămiziu.

c) Pentru obținerea complexului am utilizat un raport molar rutin:acetat de Cd = 1:2,5. În acest scop am cântărit 0,6646 g rutin și 0,6663 g acetat de Cd pe care le-am dizolvat în 50 ml metanol absolut, am adăugat 0,01 g acetat de sodiu. Amestecul obținut a fost refluxat pe baia de apă la 80°C , timp de 2 ore. Se observă apariția unui precipitat roșu –cărămiziu.

d) O altă combinație de reactanți experimentată a fost un raport molar quercetol:acetat de Pb = 1:5. Pentru aceasta am cântărit 0,3383 g quercetol și 13,2436 g acetat de Pb pe care le-am dizolvat în 100 ml metanol absolut, am adăugat 0,01 g acetat de sodiu.

Amestecul obținut a fost refluxat pe baia de apă la 80°C , timp de 2 ore. Se observă apariția unui precipitat roșu –cărămiziu. După răcire, precipitatele sunt filtrate, spălate cu metanol absolut și lăsate să se usuce la temperatura

camerei, sunt cântărite, după care au fost caracterizate fizico-chimic prin diverse teste, conform F.R. X.

e. Determinarea conținutului în Pb și în Cd prin spectroscopie de absorbție atomică în flacără (Shimadzu AA 6300) [32].

• **Rezultate și discuții**

Combinările complexe chelate astfel obținute prezintă o configurație și o constantă de stabilitate care este influențată atât de natura ligandului, cât și de configurația electronică periferică a cationului metalic generator de combinație complexă. Dintre cationii cu configurație electronică periferică specială, ionul de Pb^{2+} formează complecși destul de stabili.

A. Din rezultatele obținute și prezentate tabelar și grafic referitoare la formarea chelaților în soluție și stabilirea constantei de stabilitate a complexului se poate conchide că quercetolul reacționează cu exces de acetat de plumb în soluții hidrometanolice la $pH = 5,5$, în raport molar de 1:1, prezentând o constantă de stabilitate de $5 \cdot 10^5$.

Ulterior complecșii complecșii obținuți prin semisinteză prin combinarea liganzilor (quercetol și rutozidă) cu acetatul de plumb și acetatul de cadmiu au fost caracterizați fizică – chimic, constantându-se că se prezintă sub formă de pulberi amorfe, de culoare roșie – cărămizie, greu solubile în apă și acetonă, insolubile în eter etilic, ușor solubile în metanol, stabile la lumină, la aer, în timp;

B. Conductivitățile electrice molare ale acestor complecși determinate în soluții 10^{-3} M în metanol prezintă valori scăzute ($80 - 93 \mu S/cm^2$), ceea ce pledează pentru natura neelectrolitică a complecșilor obținuți.

C. Caracterizările spectrale IR realizate prin tehnica pastilării cu KBr au relevat prin compararea spectrului IR al ligandului quercetol cu cel al complexului său cu Pb următoarele informații :

▣ legătura metal – ligand apare la $425 cm^{-1}$, în timp ce frecvențele de grup pentru $\rho_{w(H_2O)}$ apar în intervalul $637-842 cm^{-1}$;

▣ frecvența de grup caracteristică $\nu_{(C-O-C)}$ de pe nucleu s-a deplasat de la 1262 (ligand) la 1255 (complex);

▣ frecvența de grup $\nu_{(C=C)}$ de pe nucleu s-a deplasat de la $1610 cm^{-1}$ (ligand) la $1562 cm^{-1}$, ceea ce demonstrează implicarea oxigenului de pe nucleu la formarea legăturii metal – oxigen;

▣ frecvența de grup caracteristică - C=O pentru ligand ($1666 cm^{-1}$) descrește în complex la $1646 cm^{-1}$, sugerând coordinarea grupării carbonil cu ionul metalic, precum și al grupării 5-OH a ligandului, după deprotonare;

▣ frecvențele de grup ale $\nu_{(O-H)}$ apar deplasate către valori mai mari, $3424,38 cm^{-1}$ ceea ce sugerează existența moleculelor de apă de cristalizare, respectiv formarea unui hidroxocomplex al quercetolului cu plumbul.

d. Comparând spectrul IR al ligandului rutozidă cu cel al complexului său cu Pb^{2+} se observă că:

▣ legătura metal – ligand apare la $459 cm^{-1}$, în timp ce frecvențele de grup pentru $\rho_{w(H_2O)}$ apar în intervalul $612-805 cm^{-1}$;

▣ frecvența de grup $\nu_{(C=C)}$ de pe nucleu s-a deplasat de la 1457-1571 cm^{-1} (ligand) la 1544 cm^{-1} (complex), ceea ce demonstrează implicarea oxigenului de pe nucleu la formarea legăturii metal – oxigen;

▣ frecvența de grup caracteristică - C=O pentru ligand (1656 cm^{-1}) descrește în complex la 1544 cm^{-1} , sugerând coordinarea grupării carbonil cu ionul metalic, precum și a grupării 5-OH a ligandului, după deprotonare;

▣ frecvențele de grup ale $\nu_{(O-H)}$ apar deplasate către valori mai mari 3425 cm^{-1} ceea ce sugerează existența moleculelor de apă de cristalizare, respectiv formarea unui hidroxocomplex al rutozidei cu plumbul.

E. Comparând spectrul IR al ligandului rutozidă cu cel al complexului său cu Cd^{2+} se observă că:

▣ legătura metal – ligand apare la 476 cm^{-1} , în timp ce frecvențele de grup pentru $\rho_{w(H_2O)}$ apar în intervalul 625-879 cm^{-1} ;

▣ frecvența de grup $\nu_{(C=C)}$ de pe nucleu s-a deplasat de la 1457-1571 cm^{-1} (ligand) la 160 cm^{-1} (complex), ceea ce demonstrează implicarea oxigenului de pe nucleu la formarea legăturii metal – oxigen;

▣ frecvența de grup caracteristică - C=O pentru ligand (1656 cm^{-1}) scade în complex la 1654 cm^{-1} , sugerând o slabă coordinare a grupării carbonil cu ionul metalic și cu gruparea 5-OH a ligandului, după deprotonare;

▣ frecvențele de grup ale $\nu_{(O-H)}$ apar deplasate sugerând existența moleculelor de apă de cristalizare, respectiv formarea unui hidroxocomplex al rutozidei cu cadmiu;

▣ spectrele electronice înregistrate în reflexie difuză pentru quercetol comparativ cu complexul său (quercetol-Pb) arată că maximum de absorbție înregistrat la $\lambda = 292$ nm pentru ligand, apare deplasat spre lungimi de undă mai mici, $\lambda = 280$ nm (efect hipsocrom), iar maximele de absorbție ale complexilor detectate la $\lambda = 470$ nm sunt modificate comparativ cu $\lambda = 416$ nm în cazul ligandului;

▣ spectrele electronice înregistrate în reflexie difuză pentru rutozidă comparativ cu complexul său (rutozidă-Pb) arată că maximum de absorbție înregistrat la $\lambda = 302$ nm pentru ligand apare deplasat spre lungimi de undă mai mici, $\lambda = 282$ nm (efect hipsocrom), iar maximum de absorbție al complexului detectat la $\lambda = 452$ nm este modificat comparativ cu $\lambda = 402$ nm în cazul ligandului;

▣ spectrele electronice înregistrate în reflexie difuză pentru rutozidă comparativ cu complexul său (rutozidă-Cd) arată că maximum de absorbție înregistrat la $\lambda = 302$ nm pentru ligand apare deplasat spre lungimi de undă mai mari, $\lambda = 308$ nm, iar maximum de absorbție al complexului detectat la $\lambda = 414$ nm este modificat comparativ cu $\lambda = 402$ nm în cazul ligandului.

F. Conținutul în Cd și Pb al complexelor obținuți determinat prin spectrometrie de absorbție atomică a evidențiat următoarele valori pentru :

- 2,7g% $\pm$ 0,0033 Pb în complexul rutin – Pb,
- 3,6g% $\pm$ 0,0021 Pb pentru complexul quercetin – Pb;
- 3,86 g% $\pm$ 0,0061 Cd în complexul rutin – Cd.

3.4. Influența complexilor quercetol –plumb (Qcomplex) asupra fiziologiei celulei vegetale în scopul determinării eventualelor fenomene toxice - Testarea fitobiologică prin (metoda Constantinescu)

Complexul Quercetol-plumb notat Qcomplex obținut prin semisinteză a fost supus testării fitobiologice (metoda Constantinescu) în scopul determinării eventualelor fenomene citotoxice.

S-au cercetat următoarele concentrații de Qcomplex: $6,6 \times 10^{-5}$ M (proba 1), $13,3 \times 10^{-5}$ M (proba 2), 2×10^{-4} M (proba 3), $2,6 \times 10^{-4}$ M (proba 4), $3,3 \times 10^{-4}$ M (proba 5), 4×10^{-4} M (proba 6), $4,66 \times 10^{-4}$ M (proba 7), $5,33 \times 10^{-4}$ M (proba 8), 6×10^{-4} M (proba 9), $6,6 \times 10^{-4}$ M (proba 10), $7,3 \times 10^{-4}$ M (proba 11), 8×10^{-4} M (proba 12), $8,66 \times 10^{-4}$ M (proba 13), $9,33 \times 10^{-4}$ M (proba 14), 10^{-3} M (proba 15) și martorul.

Ca material biologic s-au folosit rădăcinile embrionare ale cariopselor de grâu (*Triticum vulgare*, Mill., soiul Flamura 85, provenit de la stațiunea de Cercetare – Dezvoltare pentru Agricultură Valul lui Traian, germinate și tratate în condiții de laborator [26 - 29].

S-au făcut observații referitoare la modificările morfologice precum și la aspectul și numărul radicelelor. S-a preparat soluția mamă de concentrație 10^{-3} M în metanol din compusul studiat, care a fost notat cu Qcomplex. Soluțiile de analizat au fost obținute în concentrații diferite (1, 2, 3....15 ml), din soluția Qcomplex mamă adusă la sec și reluarea rezidului cu câte 15 ml apă fiartă și răcită. Examenul microscopic s-a efectuat în zonele meristematice ale rădăcinilor principale, secționarea realizându-se la o distanță de cca 5 mm de vârf, la interval de 6 și 24 ore de la începerea experimentului. Examinarea microscopică și fotografierea s-au efectuat la un microscop NOVEX, cu cameră foto EUROMEX (Olanda).

Rezultatele sunt exprimate ca valori medii $\pm$ eroarea standard, iar procentul de inhibare a creșterii radiculare (I%) a fost calculat pentru fiecare lot, comparativ cu martorul. Evaluarea statistică [40 - 42] a rezultatelor obținute s-a efectuat prin testul "t" Student.

• Rezultate și discuții

☐ Rezultatele măsurărilor efectuate asupra alungirii radiculare sub influența soluțiilor cercetate de Qcomplex, pe parcursul celor 5 zile, arată că în intervalul de concentrații cuprinse între $6,6 \times 10^{-5}$ M și $6,6 \times 10^{-4}$ M, Qcomplex prezintă o activitate de stimulare a creșterii radicelelor cariopselor germinate, iar la concentrații cuprinse între $7,3 \times 10^{-4}$ M și 1×10^{-3} M inhibă creșterea acestora;

☐ în intervalul de concentrații cuprins între $3,3 \times 10^{-4}$ – 1×10^{-3} M aspectul radicelelor este modificat, ele fiind torsionate, îngroșate și cu aspect de gheară;

☐ la concentrații de $5,3 - 6 \times 10^{-4}$ M (probele 8 și 9) se constată un efect inhibitor, în timp ce la concentrații cuprinse în intervalul $6,6 - 7,3 \times 10^{-4}$ M (probele 10 - 12) se manifestă un efect stimulator;

☐ Considerăm că acest comportament s-ar putea datora calității materialului germinativ.

☐ semnificative statistic pot fi considerate numai probele 1 ($6,6 \times 10^{-5}M$), 4 ($2,6 \times 10^{-4}M$), 5 ($3,3 \times 10^{-4}M$), 6 ($4 \times 10^{-4}M$), 7 ($4,66 \times 10^{-4}M$), 8 ($5,33 \times 10^{-4}M$), 9 ($6 \times 10^{-4}M$) și 14 ($9,33 \times 10^{-4}M$);

☐ de asemenea în intervalul de concentrații cuprins între $6,6 \times 10^{-5}M$ și $1 \times 10^{-3}M$ coeficienții de inhibiție cresc, cea mai mare valoare de (30 % inhibiție) întâlnindu-se la compusul de concentrație $1 \times 10^{-3}M$, această observație concordă cu datele referitoare la examenul macroscopic, precum și cu cel microscopic;

☐ rezultatele obținute la examenul microscopic după 6 ore de la începerea experimentului arată că Qcomplex încetinește ritmul dezvoltării celulare, produce frecvente degradări celulare, are efect deshidratant la nivel celular (plasmoliza celulară), iar la nivelul materialului genetic produce heterocromatinizare în profază (pot fi răspunzătoare de blocarea ciclului celular), și modificări ale formei nucleului, care devine alungit, cu contur neregulat (tabelul I);

Tabelul I. Modificări ale diviziunii celulare după 6 ore de la începerea experimentului

Nr. lot	Modificări ale diviziunii celulare după 6 ore de la începerea experimentului
1.	Celule în interfază cu aspect neclar, nucleu degradat și celule în profază cu nucleu de volum mărit.
2.	Celule aflate în profază, unele dintre ele plasmolizate cu nucleul hipertrofiat și chiar cu liza pereților celulari .
3.	Plasmoliza celulară evidentă, celule inegale în profază și celule suprapuse în interfază cu nucleu normal sau în profază cu nucleu mărit.
4.	Celule în profază, plasmolizate, cu nucleu hipertrofiat și contur neclar; liză celulară vizibilă, degradări celulare avansate, cu celule plasmolizate, în profază și interfază. De asemenea apar celule lizate fără conținut celular, dispuse în șiruri ordonate, precum și celule plasmolizate cu nucleu atrofiat și contur neclar.
5.	Celule degradate, egale, dispuse în șiruri ordonate (caracteristică a celulelor în diviziune), aflate în profază, conturul nuclear este neregulat, fiind posibile degradări ale învelișului celular. Celulele în diviziune sunt plasmolizate, iar cele inegale, de forme diferite, aflate în profază, reprezintă semne de degradare celulară.
6.	Celule degradate, plasmolizate, cu nucleu interfazic.
7.	Celule cu nucleu hipertrofiat, unele complet lizate, altele sunt în profază, sau au nucleu fără contur bine delimitat și înveliș nuclear degradat.
8.	Celule în diviziune, cu dimensiuni egale, nucleu hipertrofiat în care materialul genetic prezintă alternanțe ale regiunilor eucromatice și heterocromatice, cu blocuri heterocromatice mari, atașate învelișului nuclear, unele celule apar lizate, fără conținut celular.
9.	Celule în diviziune, dispuse în șiruri ordonate, alternate cu celule lizate. Se observă profaze și citokineză.
10.	Celule în diviziune, cu profaze, telofaze și anafaze, citokineză, care alternează cu celule lizate, unele având materialul genetic în degradare.
12.	Degradări celulare avansate și celule alungite, puternic plasmolizate în interfază.
13.	Celule cu pereți îngroșați și prelungiri asemănătoare perilor absorbant, cu nucleu mic, aflate în interfază, care alternează cu celule lizate.
14.	Degradări celulare avansate cu interfaze și profaze vizibile.
15.	Degradări celulare avansate, liză celulară, celule plasmolizate.
M	Martorul prezintă celule dispuse ordonat aflate în profază.

rezultatele obținute la examenul microscopic după 24 ore de la începerea experimentului arată că Qcomplex produce aceleași degradări, ca la 6 ore, dar apar și degradări ale materialului nuclea (tabelul II).

Efectul deshidratant la nivel celular determină frecvent plasmoliza celulară care se confirmă prin apariția unor peri absorbantți la suprafața celulelor analizate, ca o adaptare la găsirea unor noi surse de apă în mediul de viață celular.

Tabelul II. Modificări ale diviziunii celulare după 24 ore de la începerea experimentului

Nr.	
lot	Modificări ale diviziunii celulare după 24 ore de la începerea experimentului
1	Celule alungite, prozenchimatic, plasmolizate aflate în interfază și citokineză, formarea de peri absorbantți numeroși.
3	Celule dispuse ordonat, profaze și citokineză.
4	Celule lizate, alungite în interfază, cu peri absorbantți.
5	Celule parenchimatic cu nucleu hipertrofiat și aspecte de heterocromatinizarea materialului genetic, numeroase profaze evidente și rare telofaze, apariția citokinezei cu formarea de pereți celulari despărțitori dispuși longitudinal și nu transversal.
6	Celule parenchimatic mici, dispuse în șiruri ordonate, aflate în profază cu nucleu hipertrofiat, foarte voluminos, precum și celule alungite cu peri absorbantți aflate în interfază.
7	Celule aflate în profază și telofază cu citokineză, degradări celulare avansate, prezența celulelor plasmolizate.
8	Celule alungite cu nucleu mic, interfazic, nucleoli vizibili, se observă o celulă alungită cu 2 nucleu mici dispuși periferic, posibil o telofază atipică.
9	Celule parenchimatic, mici, nucleul celulelor aflate în profază este hipertrofiat cu heterocromatinizări, heterocromatina este dispusă adiacent învelișului nuclear, iar conturul nucleului apare de multe ori neregulat, fiind observate forme modificate, atipice ale nucleului aflat în diviziune.
10	Celule parenchimatic mici, nucleul celulelor aflate în profază este hipertrofiat, cu heterocromatinizări, heterocromatina este dispusă adiacent învelișului nuclear, iar conturul nucleului aflat în diviziune apare de multe ori neregulat, cu forme modificate. Apar și celule lizate, fără conținut celular și degradări celulare avansate.
11	Degradări celulare avansate, frecvente celule alungite, nucleu cu contur neregulat și forme alungite, atipice, posibile interfază, profază și citokineză.
12	Celule degradate cu nucleul hipertrofiat și materialul genetic heterocromatinizat, cu dispunerea heterocromatinei în jurul învelișului nuclear, numeroase profaze, citokineză, rare telofaze.
13	Degradări celulare, profaze cu nucleu voluminos, heterocromatinizări evidente, unele telofaze atipice, cu nucleii alipiți și înveliș nuclear dezorganizat.
14	Celule suprapuse aflate în profază și citokineză.
15	Celule alungite, cu pereți celulari îngroșați și nucleu mic, interfazic, se mai observă profaze, interfaze, telofaze și citokineze.
M	Celule dispuse neordonat, cu numeroase profaze, telofaze și citokineză.

Capitolul 4. Cercetări privind efectul antitoxic al quercetolului și al rutozidei la crustacei și moluște intoxicate cu săruri de plumb sau cadmiu

Pe lângă formarea de complecși ai metalelor cu liganzi naturali, rolul protector (antitoxic) al quercetolului, respectiv al rutozidei în intoxicația cu metale grele, poate fi apreciat prin raportare la acțiunea acestor substanțe asupra sistemelor antioxidante (SOD, catalaza) ale unor organisme marine [6 - 16]. În acest scop ne-am propus să studiem efectele acestor flavone în intoxicația acută cu clorură de cadmiu asupra crustaceului marin, *Euxinia maeotica* (Amphipoda, Crustacea), aprecierea gradului de intoxicare făcându-se prin studierea modificărilor survenite asupra parametrilor fiziologici (ritm respirator, consum de oxigen, mobilitate), schimbarea condițiilor climatice (temperatură, salinitate), activității enzimatică (superoxid dismutaza), gradul de mortalitate (imediată, întârziată), perioada de timp în care survine mortalitatea (instantaneu, după 24-48 de ore, 5-6 zile) de la începerea experimentului [13].

4.1. Efectul in vivo al rutozidei asupra speciei *Euxinia maeotica* intoxicată cu CdCl_2

Întrucât flavonele (rutozida, quercetolul) acționează asupra multor enzime, inhibându-le sau stimulându-le, ne-am propus să urmărim influența rutozidei asupra SOD (enzimă al cărei conținut crește în stresul oxidativ), sintezei proteice și parametrilor fiziologici.

• **Material și metodă**

Ca material biologic s-a utilizat crustaceul *Euxinia maeotica*, deoarece prezintă un spectru larg de toleranță la variațiile de salinitate și de temperatură ale mediului (trăiește în mediolitoralul nisipos unde formează aglomerări semnificative (mii de exemplare/m²) și a fost prelevat în perioada 14 - 18.03. 2002, aclimatizarea realizându-se ulterior la condițiile de laborator, în vase de experiență cu o capacitate de 1L). Experimentul s-a derulat pe o perioadă de 16 zile. Hrana standardizată a crustaceelor s-a asigurat zilnic.

S-au studiat variația parametrilor fiziologici (consum de oxigen, motilitate), și efectul a 2 concentrații de CdCl_2 asupra ratei viabilității indivizilor din populații. S-au administrat volume egale (2ml) în doză unică din soluțiile apoase de rutozidă de concentrații 0,7μg/L și 0,166 μg/L și de CdCl_2 de concentrații 20 și 100 μg/L, prin adăugare în mediul salin.

Crustaceele au fost divizate în 11 loturi de câte 20 de indivizi adulți, astfel:

- lot 1 – martor;
- lot 2 – crustacee intoxicate cu CdCl_2 20 μg/L;
- lot 3 - crustacee intoxicate cu CdCl_2 100 μg/L;
- lot 4 – crustacee neintoxicate, tratate cu rutozid 0,7 μg/L;
- lot 5 - crustacee neintoxicate, tratate cu rutozid 0,166μg/L;

▣ lot 6 – crustacee tratate cu rutozid 0,7 µg/L, înainte cu 24 de ore de intoxicarea cu CdCl₂ 20 µg/L;

▣ lot 7 - crustacee tratate cu rutozid 0,166 µg/L, înainte cu 24 de ore de intoxicarea cu CdCl₂ 100 µg/L;

▣ lot 8 – crustacee tratate concomitent cu rutozid 0,7 µg/L şi CdCl₂ 20 µg/L;

▣ lot 9 - crustacee tratate concomitent cu rutozid 0,166 µg/L şi CdCl₂ 100 µg/L;

▣ lot 10 – crustacee tratate cu rutozid 0,7 µg/L la 24 de ore după intoxicare cu CdCl₂ 20 µg/L;

▣ lot 11 - crustacee tratate cu rutozid 0,166 µg/L la 24 de ore după intoxicare cu CdCl₂ 100 µg/L;

Activitatea SOD s-a apreciat prin metoda Winterbourn care se bazează pe capacitatea SOD de a inhiba reducerea sării de tetrazoliu (Nitro Blue Tetrazoliu) la un formazan de către radicalii superoxid, generaţi în mediul de reacţie, prin fotoreducerea riboflavinei.

Stabilirea apariţiei efectelor letale ale clorurii de cadmiu asupra crustaceului folosit în experiment, gradul de mortalitate atins de aceste populaţii şi în ultimă instanţă efectul protector pe care-l determină prezenţa rutozidei au arătat că în primele zile ale expunerii, efectele letale afectează lent organismele, aproximativ 10% pe zi.

• Rezultate şi discuţii

▼ Din analiza datelor referitoare la variaţia parametrilor fiziologici şi a condiţiilor de mediu asupra crustaceului *Euxinia maeotica* martor (lotul 1) comparativ cu loturile tratate (2 – 11) reiese că primele reacţii la intoxicaţia cu CdCl₂ constau în reducerea mobilităţii (crustaceele nu mai înoată şi se retrag pe fundul vasului), modificarea ritmului respirator şi reducerea consumului de oxigen. Acest comportament se explică prin competiţia dintre ioni (ionul de Cd²⁺ are aceeaşi rază ionică ca şi a ionului Ca²⁺), ceea ce face posibilă blocarea pompelor membranare de Ca²⁺.

▼ Adăugarea rutozidei în cele 2 variante de concentraţii (0,7 şi 0,166 µg/L la loturile 6 şi 7) a indus o rată a respiraţiei apropiată de martor, aspect care confirmă acţiunea antitoxică a compusului, probabil prin blocarea Cd sub forma unui chelat rutozid – Cd sau prin efectul său antioxidant.

▼ Activitatea SOD la loturile intoxicate, comparativ cu lotul – martor sau cu loturile 4 - 5 (tratate cu rutozidă în diferite concentraţii) manifestă o creştere intensă, faţă de acestea, crustaceele intoxicate şi netratate (loturile 2, 3) au demonstrat o inhibiţie sensibilă a enzimei.

▼ De asemenea, se constată că rutozida în absenţa CdCl₂ nu induce biosinteza SOD, datorită absenţei stresului oxidativ, radicalii superoxid fiind indicatori ai stresului oxidativ. La loturile intoxicate cu CdCl₂ în concentraţii diferite, activitatea SOD scade de la 0,6367 (lotul martor) la 0,4719 (lotul 3) şi 0,4847 (lotul 4), probabil prin blocarea grupării –SH caracteristică enzimelor reducătoare şi nu ca urmare a absenţei stresului oxidativ.

▼ Activitatea SOD, mai redusă la loturile 6 (0,606) și 7 (0,660) demonstrează efectul antioxidant preventiv al rutozidei (se eliberează cantități mai reduse de radicali superoxid).

▼ Creșterea activității SOD în variantele în care sunt prezente Cd^{2+} și rutozida (loturile 6 - 11) s-ar putea explica prin stimularea intensă a proceselor enzimatice de apărare antioxidantă, pentru anihilarea toxicității Cd (blocarea sa în complex). Această observație se coroborează cu datele prezentate anterior referitoare la consumul de oxigen, ritm respirator, temperatura mediului de reacție, salinitate.

▼ Completarea imaginii privind contracararea stresului oxidativ de către rutozidă s-ar fi putut realiza și prin studiul activității altei enzime (catalaza), dar datele din literatura de specialitate, precum și propriile observații au condus la constatarea absenței acestei enzime la crustaceul respectiv.

▼ Efectul protector al rutozidei asupra crustaceului s-a urmărit prin stabilirea apariției efectelor letale ale clorurii de cadmiu, respectiv prin gradul de mortalitate atins de aceste populații.

☐ În primele zile ale expunerii, efectele letale afectează lent organismele, aproximativ 10% pe zi.

☐ Efectul letal 50% s-a înregistrat în a X-a zi la lotul 5 (lot neintoxicat și tratat), acesta s-ar putea datora altor factori, necunoscuți nouă, sau efectului inhibitor al rutozidei asupra unor enzime vitale ale crustaceului, cunoscute fiind proprietățile inhibitoare ale rutozidei asupra mai multor enzime (elastaza, colagenază, COX_2).

☐ Efectul letal care afectează 50% din populația supusă experimentului apare în a V-a și a VI -a zi pentru loturile intoxicate (2 și 3) și în a VI- a, a VII – a și a VIII- a zi pentru celelalte loturi intoxicate și tratate.

☐ Efectul letal 100% survine în loturile intoxicate și netratate în a XII -a , respectiv a XIII -a zi. În cazul loturilor intoxicate și tratate efectul letal 100% apare astfel : în a XVI -a zi, respectiv a XIII -a zi (loturile 6 și 7, tratate preventiv), după a X -a, respectiv a XII- a zi (loturile 8 și 9, tratate concomitent).

☐ În cazul administrării tratamentului crustaceelor intoxicate (loturile 10 și 11) după 24 ore, se constată apariția efectului letal 100%,după a XV- a, respectiv a XI -a zi.

☐ Toate acestea observații conduc la confirmarea acțiunii antitoxice a rutozidei.

4.2. Acțiunea in vivo a quercetolului asupra moluștei *Mytilus galloprovincialis* intoxicată cu acetat de plumb

Deși quercetolul (agliconul rutozidei) este mai puțin solubil în apă decât rutozida, selecția sa pentru experimentele pe moluște s-a bazat pe profilul său farmacocinetic (o absorbție mult crescută față de rutozid), la administrare orală. Menționăm că moluștele și crustaceele ne sunt mai accesibile decât șobolanii și șoarecii și din aceste motive am efectuat aceste cercetări pe ele [14]. S-au urmărit:

▼ consumul de oxigen pentru determinarea ritmului respirator (unul din principalii parametri fiziologici), influența asupra sintezei de proteine prin determinarea proteinelor solubile, stresul oxidativ prin activitatea enzimelor SOD și catalaza, determinarea concentrației de Pb^{2+} .

• **Material și metodă**

Experimentul s-a realizat pe moluște din specia *Mytilus galloprovincialis*, midie (familia Mytilidae), cu dimensiuni cuprinse între 3 și 4 cm, colectate dintr-o zonă de referință a litoralului românesc situată în populații naturale. Moluștele respective au fost aclimatizate timp de două săptămâni în laborator, în cuve de aerare cu o capacitate de 5 litri fiecare. Exemplarele recoltate au fost divizate în 5 loturi de câte 30 de indivizi adulți, astfel:

- Ø lot 1 – martor;
- Ø lot 2 – moluște intoxicate cu $Pb(CH_3COO)_2$ 60 $\mu g/L$;
- Ø lot 3 – moluște intoxicate cu $Pb(CH_3COO)_2$ 90 $\mu g/L$;
- Ø lot 4 – moluște intoxicate cu $Pb(CH_3COO)_2$ 60 $\mu g/L$, tratate concomitent cu quercetol 100 $\mu g/L$;
- Ø lot 5 - moluște intoxicate cu $Pb(CH_3COO)_2$ 90 $\mu g/L$, tratate concomitent cu quercetol 100 $\mu g/L$.

Determinările s-au efectuat în interval de 7, 14 și 21 de zile, respectiv în momentele t_1 , t_2 și t_3 .

Parametrii urmăriți au fost:

▼ consumul de oxigen pentru determinarea ritmului respirator (unul din principalii parametri fiziologici);

▼ influența asupra sintezei de proteine prin determinarea proteinelor solubile;

▼ stresul oxidativ prin activitatea enzimelor SOD și catalaza;

▼ determinarea concentrației de Pb^{2+} .

Activitatea SOD s-a apreciat prin metoda Winterbourn care se bazează pe capacitatea SOD de a inhiba reducerea sării de tetrazoliu (Nitro Blue Tetrazoliu) la un formazan de către radicalii superoxid, generați în mediul de reacție, prin fotoreducerea riboflavinei.

Determinarea activității catalazei (metoda Sinha) se bazează pe reducerea bicromatului de potasiu, în mediu acid la acetat cromic, de către peroxidul de hidrogen rezultat din stresul oxidativ. Cantitatea de acetat cromic rezultat poate fi determinată spectrofotometric în vizibil, la 570 nm.

Pb^{2+} a fost determinat prin spectrometrie de absorbție atomică în flacără (FAAS), la un spectrometru Shimadzu AA6300 cu prelucrare computerizată a datelor, conform tehnicii redată la punctul 3.3. [17].

▼ **Rezultate și discuții**

S-a constatat:

▣ o ușoară creștere a consumului de oxigen la moluștele intoxicate (loturile 2, 3), indiferent de doza primită, la toate intervalele de timp;

▣ o scădere a consumului de oxigen la moluștele intoxicate și tratate cu quercetol (loturile 4, 5), în primele 7 zile, apoi o creștere care se apropie de martor (tendință de normalizare);

▣ variația conținutului în proteine pe loturi e neuniformă, moluștele intoxicate cu doze mari au concentrații de proteine solubile mai mari decât martorul;

▣ după 14 zile de tratament, cantitatea de proteine solubile este mai mică la toate loturile; se menține o valoare ridicată la lotul 3 (concentrație mare în plumb);

▣ adaosul de quercetol (tratarea cu quercetol a loturilor intoxicate) influențează și mai mult pierderea de substanțe proteice;

▣ cea mai mare scădere a proteinei solubile se înregistrează la martor după 21 de zile, (2,805), în timp ce la celelalte loturi se înregistrează o ușoară creștere diferențiată.

Din analiza datelor referitoare la determinarea activității SOD rezultă :

§ o ușoară scădere a activității (slabe influențe) la loturile 2, 3, după 14 și 21 de zile;

§ o scădere marcantă la lotul 4 în primele 14 zile, apoi o creștere, chiar ușor peste nivelul martorului;

§ niciun fel de influență la lotul 5 față de lotul 3, în primele 14 zile, dar o scădere foarte mare după 21 de zile.

Din analiza datelor obținute la determinarea activității catalazice se constată:

▣ scăderea activității după 7 zile la toate loturile, dar mai mare la loturile 2, 3 și mai mică la loturile 4, 5;

▣ o ușoară creștere după 14 zile dar cu mult sub valoarea martorului, la loturile 2, 3 și ceva mai mare la loturile 4, 5;

▣ scăderea activității catalazei se produce în mai mare măsură la concentrațiile mai mari de acetat de plumb (lotul 3) decât la cele mici (lotul 2), în toate momentele experimentului;

▣ o ușoară creștere a activității catalazice după 21 de zile la loturile 4, 5 față de loturile 2, 3;

▣ o activitate catalazică mai mare la lotul 5 decât la lotul 4, în primele 14 zile, chiar superioară lotului martor (fie ca urmare a reducerii concentrației ionilor de plumb, complexii fiind mai greu dissociabili decât sărurile, fie ca urmare a efectului de captare a radicalilor liberi);

▣ scăderea activității catalazice este mai mare la lotul 5 și mai mică la lotul 4, sub nivelul martorului și după 21 de zile.

▣ concentrația Pb^{2+} determinată în hepatopancreasul moluștei *Mytilus galloprovincialis* scade la lotul 4 (intoxicat și tratat cu quercetol) comparativ cu lotul 3 (intoxicat cu acetat de plumb) la timpul t_1 (după 7 zile);

▣ la următoarea prelevare, 14 zile (t_2), nu se remarcă modificări, iar după 21 de zile (la timpul t_3) se constată o scădere a concentrației de acetat de plumb la lotul 5 (intoxicat și tratat), comparativ cu lotul 2 (doar intoxicat),

▣ variația concentrației Pb^{2+} determinată în cochilia moluștei se prezintă astfel:

- după 7 zile scade concentrația Pb^{2+} la lotul 4 față de loturile 2, 3;
- după 14 zile se constată chiar o ușoară creștere a concentrației ionilor de Pb^{2+} ;
- după 21 zile se manifestă o scădere a concentrației Pb la loturile 4 și 5, comparativ cu loturile 2 și 3.

Aceste variații s-ar putea explica și prin posibila competiție între ionii de Ca^{2+} din cochilie și Pb^{2+} pentru situsurile generatoare de complecși ai quercetolului, precum și prin efectul cumulativ al acestuia.

Capitolul 5. Efectul quercetolului asupra șoarecilor intoxicați cu acetat de plumb

Rezultatele preliminarilor încurajatoare, obținute pe crustacei și moluște, biomarkeri ai poluării marine, ne-au determinat să extindem gama cercetărilor și asupra altor animale de laborator (șoareci, șobolani) în vederea stabilirii efectului de antidot al quercetolului (raport de bioinactivare) prin inducerea unui experiment de intoxicație acută cu acetat de plumb.

5.1. Evaluarea efectului antidotic al quercetolului

Pentru a testa compusul quercetin din punct de vedere al efectului antidotic în intoxicația acută cu acetat de plumb, s-a determinat potențialul antidotic al unei doze molare unice, în condițiile în care au variat dozele de acetat de plumb administrate.

Apoi s-a raportat DL_{50} a acetatului de plumb obținută în prezența tratamentului cu quercetol, la DL_{50} a acetatului de plumb în absența tratamentului. Valoarea raportului astfel obținută a reprezentat indicele de protecție a substanței investigate, notat cu I_p .

v Material și metodă

Intoxicația acută s-a realizat cu acetat de plumb $\cdot 3H_2O$, *p.a.*, administrat per os și i.v. sub formă de

Doza de quercetol administrată per os cu sonda, intragastric respectiv (*p.o.*) a fost de 70 $\mu\text{mol/kg}$ m.c., în volum unic de 40 ml/kg m.c., prin suspendare în Tween 80, de concentrație 2% în apă distilată (concentrație 1,75 $\mu\text{mol/ml}$). Pentru administrare parenterală (i.v.) acetatul de plumb a fost dizolvat în soluție sterilă de manitol 5% și administrat în volum de 40 ml/kg m.c.

S-au folosit șoareci albi, sănătoși, repartizați în loturi omogene din punct de vedere al masei corporale și a repartiției pe sexe de câte 5, 10 și 20 animale, cu masa corporală între 18 - 25 g, masculi și femele, alimentați cu dietă constantă, cazați în condiții adecvate de microclimat, în afara contactului cu insecticide.

Pentru evaluarea efectului antidotic al quercetolului au fost determinate experimental trei doze de acetat de plumb, care au trebuit să îndeplinească următoarele condiții:

- ♣ dozele să fie în progresie geometrică;
- ♣ doza mică să asigure supraviețuirea unui procent de 70-95% / dintre indivizii unui lot de 20 de animale;
- ♣ doza mare să asigure supraviețuirea unui procent de 5-30%/ dintre indivizii unui lot de 20 de animale.

Perioada de observație a animalelor a fost de 72 ore de la momentul aplicării tratamentului. Înregistrarea mortalității s-a efectuat la 0,5, 1, 2, 24, 48 și 72 de ore de la începerea tratamentului. Cu ajutorul unui model matematic bidimensional de corelație (*ecuație de estimare sau de regresie*) a fost analizată corelația cantitativă dintre efectul antidotic și o singură caracteristică specifică, reprezentată de valorile dozei de toxic bioinactivate în condiții riguros precizate și pentru măsurarea exactității cu care ecuația de estimare se aplică datelor experimentale pe care le modelează, s-a utilizat *coeficientul de corelație* (*r*).

• Rezultate și discuții

☐ efectul obținut, exprimat procentual, sub aspectul mortalității înregistrate experimental, pentru fiecare doză de toxic administrată;

☐ potențialul toxic al acetatului de plumb administrat pe cale *i.v.*, în condițiile tratamentului cu doză unică de $70 \mu\text{mol/kg m.c.}$, quercetol, administrat *p.o.* la șoarece, și potențialul toxic al acetatului de plumb în absența tratamentului;

☐ indicele de protecție în intoxicația acută cu acetat de plumb administrat pe cale *i.v.*, rezultat în condițiile experimentale precizate, al unei doze unice de $70 \mu\text{mol/kg m.c.}$ quercetol administrat *p.o.* la șoarece;

☐ numărul de μmoli de toxic bioinactivați, ce revin la $1 \mu\text{mol}$ de quercetol.

În tabelul III sunt prezentate valorile următorilor parametri farmacologici determinați experimental.

Tabelul III. Caracteristici farmacotoxicologice ale probei de quercetol

Lot de animale	Doza de quercetol $\mu\text{moli/kg m.c.}$	Doza de acetat de plumb $\mu\text{moli/kg m.c.}$	Efect % Mortalitate	Potențial Toxic (acetat de plumb)	Indice de protecție I_p	Raport de bioinactivare $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ / quercetol
1	70	448,2	10	3,297	1,43	2,18
2		502	40			
3		562,2	85			
4	-	316,3	20	3,454	-	-
5		354,3	55			
6		396,8	80			

Aceștia sunt reprezentați de:

▼ dozele micromolare de acetat de plumb, în progresie geometrică, care asigură supraviețuirea a 70 - 95% din indivizii unui lot de 20 animale (doza mică) sau 5 - 30% (doza mare) au fost de: 448,2, 502, 562,2, 316,3, 354,3, 396,8 $\mu\text{mol/kg m.c}$

- efectul obținut, exprimat procentual, sub aspectul mortalității înregistrate experimental, pentru fiecare doză de toxic administrată;

- potențialul toxic al acetatului de plumb administrat pe cale *i.v.*, în condițiile tratamentului cu doză unică de 70 $\mu\text{mol/kg m.c.}$, quercetol, administrat *p.o.* la șoarece, și potențialul toxic al acetatului de plumb în absența tratamentului;

- indicele de protecție în intoxicația acută cu acetat de plumb pe cale *i.v.*, rezultat în condițiile experimentale precizate, a unei doze unice de 70 $\mu\text{mol/kg m.c.}$ quercetol administrat *p.o.* la șoarece;

- numărul de μmol de toxic bioinactivați, ce revin la 1 μmol de quercetol.

În tabelul IV sunt prezentate ecuațiile de regresie a efectului:

▼ antidotic a produsului quercetol în intoxicația acută cu acetat de plumb funcție de doza de toxic, determinată experimental;

▼ toxic a acetatului de plumb, determinat experimental.

Tabelul IV. Ecuațiile de regresie - efect antidotic Quercetol – doză acetat de plumb și a efectului toxic al acetatului de plumb

Denumire substanță	Ecuația de regresie	
	Efect antidotic	Efect toxic
Quercetol + Acetat de plumb	$Y = -65,310 + 21,010 x$	-
Acetat de plumb	-	$Y = -38,444 + 17,061 x$

În tabelul V sunt prezentate rezultatele analizei de corelație a efectului antidotic al compusului quercetol funcție de doza de acetat de plumb.

Tabelul V. Parametrii analizei de corelație pentru compusul quercetol

Denumirea substanței	Coeficient de corelație $R_{Y/X}$	Coeficient de determinare $D_{Y/X}$	$D_{Y/X}$ ajustat după grade de libertate	Eroare standard de fitare	Test F
Quercetol	0,997	0,994	0,989	0,113	196,9

Din analiza datelor de corelație a efectului antidotic cu doza de acetat de plumb se constată următoarele aspecte mai importante :

☐ coeficientul de corelație r are valoarea 0,997, ceea ce reflectă o corelație foarte bună între variabilele cuprinse în analiză;

coeficientul de determinare $D_{y/x}$ are valoarea 0,994, ceea ce demonstrează că variația totală a efectului antidotic se datorează în cea mai mare măsură, variabilei independente – doza de toxic;

coeficientul de determinare ajustat după numărul gradelor de libertate, $D_{y/x}$ ajustat, are valoarea 0,989, ceea ce demonstrează că precizia cu care se determină efectul antidotic prin intermediul ecuației de estimare este ridicată;

eroarea de fitare este 0,113, ceea ce arată că dispersia valorilor experimentale ale efectului antidotic de la linia de regresie sunt mici și determinările experimentale au fost făcute cu acuratețe;

valoarea statistică F calculată este mai mare decât valoarea critică $F_{0,950, 3, 1} = 10,1$, ceea ce denotă că testul global al relației de determinare dintre efect și logaritmul dozei de acetat de plumb prin ecuația de estimare este semnificativ pentru substanța investigată (quercetol).

În tabelul VI sunt prezentați parametrii analizei de regresie a efectului antidotic funcție de doza de acetat de plumb, determinați conform metodologiilor specifice pentru acest tip de analiză cantitativă :

- ✓ coeficientul de regresie $b_{y/x}$;
- ✓ coeficientul a (ordonata la origine), precum și eroarea standard;
- ✓ valoarea testului – "t" (Student);
- ✓ intervalul de încredere 95% al celor doi coeficienți.

Tabelul VI. Analiza ecuației de regresie a efectului antidotic funcție de doza de acetat de plumb

Substanță	Parametrii regresiei $y=a +bx$	Eroarea standard	Valoarea testului "t"	Interval de încredere 95%
Quercetol	$a = -65,310$	5,005	-13,046	-128
	$b = 26,010$	1,853	14,033	2,426

$t_{critic} = 6,314$

Analiza datelor prezentate în tabelul IV referitoare la regresia efectului antidotic funcție de doza de acetat de plumb scoate în evidență următoarele aspecte :

✓ ecuația prezintă coeficientul de regresie semnificativ, ceea ce demonstrează că determinările experimentale au fost efectuate riguros;

✓ deoarece eroarea standard are un nivel relativ mic, datele experimentale utilizate la determinarea indicelui de protecție au asigurat un nivel de acuratețe corespunzător acestui tip de determinări.

5.2. Evaluarea reducerii efectului toxic al acetatului de plumb în prezența quercetolului

Cercetările proprii realizate anterior pe crustacee (*Euxinia maeotica*), moluște (specia *Mytilus galloprovincialis*) și șoareci intoxicați cu acetat de

plumb și tratați cu quercetol au evidențiat rolul quercetolului în scăderea activității enzimatică a SOD, catalazei, demonstrând indirect acțiunea sa ca posibil antidot (raport de bioinactivare acetat de plumb/quercetol = 2,18 și indice de protecție 1,43).

Aceste rezultate ne-au motivat reluarea experimentelor pe animale de laborator pentru determinarea altor parametri care pot constitui markeri ai reducerii efectului toxic.

• **Material și metodă**

Pentru desfășurarea experimentului s-au alcătuit 6 loturi a câte 6 exemplare de șobolani maturi, de ambele sexe, din rasa Wistar, cu greutatea corporală precizată (150 ± 5 g), furnizați de Institutul Cantacuzino, București, care s-au menținut în condiții bioclimatice de laborator și care au primit apă de băut deionizată administrată ad libidum. Animalele au primit zilnic, la aceeași oră (9 a.m.), prin gavaj, doze de quercetol, acetat de plumb sau apă deionizată (după caz) pe o perioadă de 12 zile.

Loturile au primit următorul tratament :

- ▼ lot 1 – quercetol 0,05g/Kg/corp;
- ▼ lot 2 - quercetol 0,1g/Kg/corp;
- ▼ lot 3 – acetat de plumb soluție 20%, 0,1 ml/Kg/corp;
- ▼ lot 4 - acetat de plumb soluție 20%, 0,1 ml/Kg/corp și quercetol 0,05g/Kg/corp;
- ▼ lot 5 - acetat de plumb soluție 20%, 0,1 ml/Kg/corp și quercetol 0,1g/Kg/corp;
- ▼ lot 6 – martor, apă deionizată, 0,1 ml/Kg corp.

Quercetolul s-a administrat p.o. prin suspendarea a 0,5 g, respectiv 1 g în mucilag de carboximetilceluloză sodică 1% completat la 5 ml cu apă deionizată, iar acetatul de plumb s-a administrat sub formă de soluție 20%, 0,1 0,1 ml/Kg corp.

După 11 zile de la administrare s-a recoltat urina din 24 de ore pentru determinarea acidului Δ -aminolevulinic și a concentrației ionilor de Pb^{2+} .

În a 12 a zi de la administrare animalele au fost sacrificate prin decapitare, sub anestezie generală cu eter, la aceeași oră ca la administrare, în scopul recoltării probelor de sânge (pe EDTANa₂), pentru determinarea hemoglobinei și a hematocritului și pentru efectuarea examenului histopatologic.

Determinarea concentrației de plumb în urină s-a realizat prin spectrometrie de absorbție atomică în flacără (FAAS), la un spectrometru Shimadzu AA6300 cu prelucrare computerizată a datelor.

• **Rezultate și discuții**

Analiza statistică a datelor (semnificația diferenței mediilor prin testul "t" Student la $p < 0,05$) s-a efectuat numai pentru acidul Δ -aminolevulinic. Din analiza rezultatelor prezentate în tabelul VII reiese că:

♣ față de martorii neintoxicați (L2Q2 și L6M) cantitatea de δ -ALA eliminată prin urină, sub influența quercetolului (L4Q1Pb) prezintă semnificație statistică;

♣ față de martorul neintoxicat (L2Q2) cantitatea de δ -ALA eliminată prin urină comparativ cu lotul intoxicat (L3Pb) prezintă semnificație statistică;

♣ niciuna din dozele de quercetol administrate (0,05 g/Kg m.c. și 0,1 g/Kg m.c) nu produce modificări semnificative ale parametrului analizat (concentrația acidului δ -aminolevulinic) comparativ cu valorile lotului martor intoxicat și netratat (L3Pb);

♣ diferența dintre medii se datorează probabil fluctuației de eșantionaj, nu este semnificativă și nu poate fi luată în considerare pentru a afirma un efect sau o valoare farmacodinamică;

♣ creșterea redusă a eliminării δ -ALA la loturile intoxicate și tratate cu quercetol, credem că se datorează chelatării ferului, care reduce astfel sinteza de hemoglobină.

Tabelul VII. Influența tratamentului cu quercetol asupra concentrației acidului δ -aminolevulinic în intoxicația cu acetat de plumb. Semnificația diferenței mediilor prin testul "t" Student la $p < 0,05$ pentru L2Q2

Variable	Media (conc. mg/L)	Dev. standard	Nr. cazuri	Dif. mediilor	Dev. Standard a dif.	t	Grade de libertate	p
L2Q2	4.396	3.693						
L3Pb	52.146	16.074	3	-47.75	13.724	-6.02	2	0.026
L2Q2	4.396	3.693						
L4Q1Pb	37.386	12.232	3	-32.99	9.415	-6.06	2	0.026
L2Q2	4.396	3.693						
L5Q2Pb	36.516	16.845	3	-32.12	16.572	-3.35	2	0.078
L2Q2	4.396	3.693						

Concentrația ionilor de plumb excretată în urină a scăzut la loturile 4 și 5 (care au primit concomitent quercetol și acetat de plumb) față de lotul 3 (tratată cu acetat de plumb), mai evident la administrarea concentrației de 0,05 g/Kg de quercetol. Aceasta presupune blocarea ionilor de plumb sub forma unui complex quercetol-Pb, greu solubil în apă, ceea ce evidențiază un posibil rol de antidot al quercetolului.

Pentru eliminarea ionilor complexați considerăm că ar fi recomandată administrarea concomitentă a unor diuretice, deși ne-am fi așteptat ca și quercetolul să acționeze în acest sens.

Pentru eliminarea ionilor complexați considerăm că ar fi recomandată administrarea concomitentă a unor diuretice, deși ne-am fi așteptat ca și quercetolul să acționeze în acest sens.

Din analiza valorilor hematologice (valorile medii ale hemoglobinei și ale hematocritului) reiese că :

■ la loturile 1 - 3 concentrația hemoglobinei prezintă valori normale (13-13,8 g/100 ml), în timp ce la loturile 4 - 5 hemoglobina se găsește în cantități mai mici comparativ cu valorile normale;

■ valorile hematocritului pentru loturile 4 (34,66%) și 5 (33,1%) comparativ cu lotul 3 (32,75%) au fost mai mici sau sensibil egale, ceea ce sugerează că pe perioada de timp afectată experimentului, quercetolul nu a reușit să inducă biosinteza hemului și nici să reducă efectele lizei vasculare.

Examenul histopatologic îl considerăm cel mai concludent la nivelul rinichilor, unde s-a observat un grad diferit de afectare al acestora la loturile intoxicate cu acetat de plumb și netratate, precum și apariția unor zone ale tubilor renali mai protejate de prezența quercetolului (loturi intoxicate și tratate cu quercetol).

Acțiunea quercetolului asupra activității catalazei și a SOD se manifestă astfel:

■ la animalele tratate cu quercetol activitatea catalazei și a SOD este mai mică decât la martor, fapt atribuit proprietăților antioxidante ale flavonolilor;

■ animalele intoxicate și tratate cu quercetol prezintă o ușoară scădere a activității catalazice față de martor și de martorul intoxicat;

■ quercetolul singur, administrat animalelor intoxicate influențează neconcludent activitatea SOD;

■ quercetolul administrat animalelor neintoxicate induce o scădere a activității SOD, probabil ca urmare a proprietăților sale reducătoare.

Capitolul 6. Obținerea unui extract flavonozidic selectiv

Rezultatele obținute ne-au motivat orientarea cercetărilor spre o sursă de obținere a quercetolului, respectiv spre obținerea unui extract flavonozidic, îmbogățit în quercetol, care ulterior să constituie semifabricat pentru o formă farmaceutică de uz oral.

• Material și metodă

Sursa au constituit-o bobocii floralii ai speciei *Sophora japonica* L. În acest scop s-au efectuat cercetări în vederea verificării identității și stabilirii calității produsului vegetal. S-au practicat examenele macro- și microscopic, chimic calitativ și cantitativ.

• Rezultate și discuții

■ Examenul macroscopic a permis observarea unor boboci floralii care prezintă un caliciu de culoare verde, constituit din cinci dinți inegali, o corolă de

culoare verde-gălbuie cu dimensiuni cuprinse între 4-5 mm lungime și 0,5 -1 mm diametru, au un gust ușor amăru, mucilaginos și sunt lipsiți de miros.

☐ Examenul microscopic pe pulbere clarificată în cloralhidrat și colorată cu floroglucină a permis observarea grăuncioarelor de polen, perilor tectori monocelulari cu cuticulă ușor verucoasă, fragmentelor de peri monocelulari recurbați de pe sepale, prezența papilelor de pe petale; ele corespund caracterelor descrise în literatura de specialitate pentru ***Sophorae flores***.

☐ Reacțiile efectuate pentru identificarea flavonelor (reacția cianidolului, complexarea cu AlCl_3 și acid boric, formarea fenoxizilor) ne-au confirmat prezența grupelor funcționale de pe nucleu (OH fenolice, gruparea cetonică).

☐ Cercetările cromatografice (CSS) au condus la identificarea quercetolului (ca aglicon), a rutozidei $R_f = 0,65$ (3-rutinozida quercetolului) compuși dominanți în ***Sophorae flores***.

☐ Deoarece examenele macro- și microscopic, reacțiile chimice calitative și cercetările CSS au confirmat identitatea produsului vegetal recoltat de noi, ne-a preocupat calitatea sa pentru a ști în ce măsură poate fi folosit ca materie primă pentru obținerea unui extract flavonozidic selectiv.

☐ Pentru determinarea calității produsului vegetal recoltat (***Sophorae flores***) am procedat la determinarea conținutului în flavone, folosind metoda colorimetrică oficializată de FR X la monografia ***Cynarae folium*** [24].

☐ Concentrația în flavonozide din ***Sophorae flores***, determinată cu ajutorul curbei etalon, este 8,64 g% flavone exprimate în rutozidă. Aceasta se situează sub condițiile prevăzute în literatura de specialitate prevede un conținut de (10-15 g%).

6. 3. Stabilirea unui procedeu tehnologic de obținere a extractului flavonozidic

Cunoscând identitatea și calitatea produsului vegetal am experimentat 3 procedee de obținere a unor extracte flavonozidice, diferite prin timpul de hidroliză (10, 15 și 24 de ore) și raportul produs vegetal/solvent (1: 5, 1: 10 și 1: 15) și care conțin agliconi, deoarece aceștia sunt absorbiți la administrarea orală și nu heterozidele.

• **Material și metodă**

Știind că solubilitatea flavonelor este influențată nu numai de natura solventului (metanol 20% și 40%) ci și de temperatura și timpul de extracție, ne-am propus să experimentăm refluxarea ca procedeu de extracție. Pentru început am urmărit să obținem heterozidele din care apoi prin hidroliză cu HCl 2N, timp de 10, 15 ore și 24 de ore, urmată de extracția cu acetat de etil, să obținem agliconii.

Menționăm că acetatul de etil este un solvent selectiv pentru agliconii flavonozidelor, dar extrage și flavonozide. Soluțiile extractive reunite, filtrate,

uscate pe sulfat de sodiu anhidru au fost concentrate la rotavapor, la 30°C și uscate la etuva de vid la aceeași temperatură și presiune scăzută (0,6 barri) până la obținerea extractului uscat (cu cel mult 5% materii volatile). S-au propus 3 variante de obținere a unui extract flavonozidic uscat. Acestea folosesc ca metodă de obținere refluxarea la cald.

• **Rezultate și discuții**

☐ S-au obținut extracte uscate de culoare galben – brună, a căror cantitate de a variat de la 1% (varianta A, timp de hidroliză 10 ore), la 7,01% (varianta B, timp de hidroliză 15 ore) și 0,66% (varianta C, timp de hidroliză 24 de ore);

☐ Cele mai bune rezultate s-au obținut prin refluxarea produsului vegetal cu metanol 40%, urmată de hidroliza soluției extractive cu HCl 2N timp de 15 ore și extracție cu acetat de etil (Varianta B, raport produs vegetal/solvent 1/10). Mărirea timpului de hidroliză de la 10 ore (Varianta A) la 15 ore (Varianta B) asigură o mai bună scindare a flavonozidelor la agliconi, fapt demonstrat prin cantitatea mai mare de reziduu obținut prin extracții repetate cu acetat de etil.

Capitolul 7. Elaborarea metodologiei de control al calității extractului flavonozidic selectiv

Pentru determinarea calității extractelor flavonozidice selective obținute am elaborat o metodologie de control în care am inclus parametrii de calitate stabiliți de FR X și Farmacopeea Europeană ediția a IV -a la monografia de generalități **Extracta**.

Astfel s-au urmărit determinarea caracterelor organoleptice, a solubilității, pH-ului, conținutului în fier și metale grele, pierderii prin uscare, identificarea prin reacții chimice caracteristice și prin CSS a flavonelor, precum și dozarea lor.

v Rezultate și discuții

☐ Toate cele 3 extracte au prezentat un aspect cristalin, culoare galben-brună, sunt higroscopice, ușor solubile în etanol și metanol, insolubile în apă distilată și puțin solubile în eter;

☐ pH - ul extractelor variază între 2,5 - 4,5 (determinat potențiometric);

☐ valoarea pierderii prin uscare pentru extracte se încadrează în limita admisă de FR X de maximum 5%;

☐ de asemenea extractele obținute se înscriu în limitele admise de FR X pentru conținutul în fier și metale grele (cel mult 0,04%);

☐ reacția cianidolului este pozitivă în toate extractele, mai intensă la extractul obținut prin varianta B, toate soluțiile sunt colorate în galben de intensitate diferită; fluorescența galben-verzuie a fost observată la toate extractele;

☐ din cercetările CSS reiese că doar extractele A și B conțin quercetol ($R_f = 0,51$, identic cu cel al substanței de referință), iar celelalte spoturi separate aparțin unor flavone care n-au fost identificate datorită lipsei de etaloane, probabil kaempferol și eventual un izoflavonol (genisteina) compuși citați în literatura de specialitate ca fiind prezenți în ***Sophorae flores***;

☐ de asemenea extractele A și B prezintă câte un spot cu R_f identic cu al rutozidei, ceea ce sugerează că hidroliza ei nu a fost completă;

☐ concentrația în quercetol din extractele flavonozidice determinată prin raportare la curba etalon este de 0,56 g% (extractul A), 5,19g% (extractul B) și 0,23 g% (extractul C).

v Aprecierea calitatății extractelor a fost întregită și prin determinarea conținutului în polifenoli totali (tabelul VIII) exprimat ca mg QE /g produs uscat (extract A - $68 \pm 7,23$, extract B - $64 \pm 4,55$ și extract C - $55,5 \pm 23,73$), precum și a capacității antioxidante (tabelul IX) exprimată ca mM TROLOX/ g s.u., (pentru extract A - $20,10 \pm 0,15$, extract B - $20,36 \pm 0,91$ și pentru extract C - $17,06 \pm 0,19$) sau ca mmoli/ml Fe^{2+} (extract A = 3,35, extract B = 5,07, extract C = 4,23), tabelul X.

Tabelul VIII. Conținutul în polifenoli totali din extractele selective din *Sophorae flores*

Extract	Absorbanța $\lambda = 760 \text{ nm}$ (diluție 1/8)	Polifenoli totali (mg QE $\pm$ S.D) /g extract selectiv	Absorbanța $\lambda = 760 \text{ nm}$ diluție 1/20	Polifenoli totali (mg QE $\pm$ S D)/g extract selectiv
A	1,590	Nu a fost detectat	0,769	$68 \pm 7,23$
	1,599		0,784	
	1,595		0,776	
	1,601		0,765	
B	1,587	Nu a fost detectat	0,734	$64 \pm 4,55$
	1,585		0,745	
	1,587		0,745	
	1,588		0,743	
C	1,440	Nu a fost detectat	0,643	$55,5 \pm 23,73$
	1,440		0,608	
	1,420		0,666	

Tabelul IX. Capacitatea antioxidantă a extractelor de *Sophora japonica*

Extract	Capacitatea antioxidantă mM Trolox / g produs uscat, diluție 1/8	Capacitatea antioxidantă mM Trolox / g produs uscat, diluție 1/20
A	$16,94 \pm 0,15$	$20,10 \pm 0,15$
B	$15,53 \pm 0,71$	$20,36 \pm 0,91$
C	$14,81 \pm 0,23$	$17,06 \pm 0,19$

Tabelul X. Determinarea capacității antioxidante a extractelor flavonozidice selective din *Sophorae flores* prin metoda FRAP

Nr. crt.	Absorbanța $\Lambda=593\text{ nm}$	$\Delta A_1 = A_1 - A_{\text{martor}}$ $A_{\text{martor}}=0,042$	Concentrația în Fe^{2+} (mmoli/mL)
Extract A	0,605	0,563	3,35
Extract B	0,879	0,837	5,07
Extract C	0,745	0,703	4,23

▼ Valorile celor două determinări (conținutul în polifenoli totali și capacitatea antioxidantă) au fost supuse interpretării statistice în vederea stabilirii unei corelații între ele; s-a obținut coeficientul de corelație $r = 0,91497$, ceea ce arată existența unei corelații accentuate între capacitatea antioxidantă și conținutul în polifenoli totali al celor 3 extracte;

▼ Tot din calcul statistic au rezultat următorii coeficienți de regresie: $a = 2,9048$ și $b = 0,259$; întrucât coeficientul de regresie b are valoarea de 0,259, regresia este pozitivă, ceea ce semnifică o corelație între cei doi parametri, implicit între conținutul în polifenoli totali și capacitatea antioxidantă a extractelor;

Datele obținute sunt redate în în tabelul XI.

Așa cum se poate observa coeficienții de regresie sunt $a = 2,9048$ și $b = 0,259$. Întrucât coeficientul de regresie are valoarea de 0,259, regresia este pozitivă.

Tabelul XI. Analiza de regresie pentru cele 3 extracte din *Sophorae flores*

Regression Statistics						
Multiple R	0.91497					
R Square	0.83717					
Adjusted R Square	0.67434					
Standard Error	1.034439					
Observations	3					
ANOVA						
	df	SS	MS	F	SigF	
Regression	1	5.501603	5.501603	5.141378	0.264428	
Residual	1	1.070064	1.070064			
Total	2	6.571667				
	Coef.	Std. Er.	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%
Intercept	2.904836	7.186394	0.404213	0.755453	-88.4066	94.21624
X Variable	0.259816	0.114585	2.267461	0.264428	-1.19611	1.715744

Potențialul toxic al extractelor A și B, (DL_{50}), s-a evaluat prin administrarea p.o. a 3000 mg/kg m.c. și prin aprecierea ratei de supraviețuire a șobolanilor și urmărirea comportamentului acestora pe durata experimentului. Pe perioada desfășurării experimentului, animalele n-au murit, nu s-au

constatat modificări în comportamentul lor, dar se poate menționa că materiile fecale s-au colorat în negru mai intens și au prezentat consistență solidă.

Capitolul 8. Cercetări privind standardizarea, validarea și optimizarea procesului tehnologic de obținere a unui extract flavonozidic selectiv prin metodologia suprafeței de răspuns, precum și perioada de stabilitate (valabilitate) a extractului

Pentru standardizare s-a considerat că poate fi utilizat ca parametru de calitate conținutul în quercetol (4,90-5,20). Validarea s-a bazat pe repetabilitatea rezultatelor.

În vederea obținerii unui extract flavonozidic cu un conținut ridicat în quercetol și în polifenoli totali, cu capacitate antioxidantă mare, s-au prelucrat datele experimentale obținute cu ajutorul unui program de optimizare Box Wilson.

S-au stabilit ca variabile independente X_1 (raportul produs vegetal - solvent = X_1 , timp de hidroliză exprimat în ore = X_2), iar ca variabile dependente polifenoli totali (μM) = Y_1 , capacitate antioxidantă (mM Trolox /g s.u.) = Y_2 .

Coeficienții ecuațiilor de răspuns determinați cu ajutorul acestor parametri au servit la trasarea graficelor de răspuns în spațiu tridimensional și a graficelor de contur cu nivele de izorăspuns; iar prin tehnica suprapunerii graficelor de contur s-au localizat zonele de "optim" pentru răspunsurile urmărite.

Capitolul 9. Cercetări preliminare privind obținerea unui produs farmaceutic pe bază de extract flavonozidic selectiv

• Material și metodă

Din extractul B, cu cel mai mare conținut în quercetol (5,19 g%), capacitate antioxidantă (20,36 mM TROLOX/ g s.u.) și polifenoli totali ($64 \pm 4,55$ QE/ g extract selectiv), s-au formulat două variante de obținere a comprimatelor neacoperite de uz oral, în care a variat concentrația unora dintre excipienții aleși pentru formulare (α -lactoză monohidrat, celuloză microcristalină, amidonglicolat de sodiu). În acest sens s-au propus formulele din tabelul XII, iar ca procedeu metoda comprimării directe.

Formulele propuse asociază principiul activ (extractum ***Sophorae flores***) 100 mg/cp și o serie de excipienți necesari obținerii a comprimatelor prin comprimare directă, constituiți din lactoză monohidrat (diluant), Avicel 102 PH (diluant), Amidon pregelatinizat (liant), Amidonglicolat de sodiu (superdezagregant), stearat de magneziu (lubrifiant, antiadeziv) și dioxid de siliciu coloidal (adsorbant).

Tabelul XII. Formula comprimatelor cu extract de *Sophorae flores*

Nr. crt.	Denumirea substanței	Cantitatea mg/comprimat		Rol în formulare
		Formula 1	Formula 2	
1.	Extractum <i>Sophorae flores</i> cu 5,19% quercetol	100	100	principiu activ
2.	α – lactoză monohidrat 100 mesh	315	400	diluant
3.	Celuloză microcristalină 102	300	211,75	diluant
4.	Amidon pregelatinizat	100	100	liant, dezagregant
5.	Amidonglicolat de sodiu (Primojel)	26,5	12,75	superdezagregant
6.	Dioxid de siliciu coloidal 200	-	17	adsorbant
7.	Stearat de magneziu	8,5	8,50	lubrifiant, antiadeziv
8.	Masă totală /cp.	850		-

• **Rezultate și discuții**

Formula 2 propusă s-a dovedit a fi o alegere judicioasă, excipienții direct compresibili au asigurat pulberii o bună capacitate de curgere, pulberea nu a gripat mașina de comprimat, nu a aderat de poansoane și a permis expulzarea ulterioară a comprimatului.

Capitolul 10. Elaborarea metodologiei de control al calității comprimatelor convenționale cu extract de *Sophorae* 100 mg/cp

• **Material și metodă**

Metodologia de control al comprimatelor neacoperite obținute cu extractum ***Sophorae*** (100 mg/comprimat) a vizat parametrii oficiali din FR X (aspect, uniformitatea masei, testul de dezagregare, determinarea rezistenței mecanice) și extragerea, identificarea, dozarea flavonolilor prin reacții chimice specifice și analiză cromatografică (CSS).

• **Rezultate și discuții**

Comprimatele obținute prezintă uniformitatea masei între 850 mg $\pm$ 5% (formula 1) și 849,97 $\pm$ 5% mg/comprimat pentru formula 2, se dezagregă în 2 minute și 20 secunde (formula 1) și în 4 minute (formula 2) și au o rezistență mecanică de 144 N (formula 1) și 100 N (formula 2). Principiile active reprezentative (flavonoli) au fost extrase, identificate prin reacții chimice caracteristice (reacția cianidolului, reacția oxalo-borică), prin CSS, iar determinarea cantitativă a evidențiat un conținut între 3,89 - 4,152 mg quercetol /comprimat (formula 1) și între 5,449 - 6,1242 mg quercetol /comprimat) pentru

formula 2. Datele referitoare la aceste determinări sunt prezentate în tabelul XIII.

Tabelul XIII. Caracteristicile comprimatelor cu extract uscat din *Sophorae flores*

Nr. crt.	Caracteristici	Rezultate	
		Formula I	Formula II
1.	Aspect	Comprimatele neacoperite obținute prezintă o formă ovală, au margini intacte, suprafață plată, aspect marmorat, dispersare neuniformă a extractului în masa comprimatului	Comprimatele neacoperite obținute prezintă o formă ovală, au margini intacte, suprafață plată, aspect marmorat, se constată o mai bună dispersare a extractului în masa comprimatului
2.	Culoare	cafenie	cafeniu închis
3.	Miros	aromat	aromat
4.	Uniformitatea masei	850 mg $\pm$ 5%	849,97 $\pm$ 5%
5.	Timp de dezagregare	2 minute și 20 secunde	4 minute
6.	Rezistența mecanică	144 N $\pm$ 10%	100 N $\pm$ 10%

Capitolul 12. Concluzii generale

În partea teoretică a lucrării s-au evidențiat sursele intoxicației profesionale și neprofesionale cu compușii plumbului, date despre farmacocinetica intoxicației cu plumb, toxodinamia și mecanismul intoxicației cu plumb, consecințele sale biologice, precum și biomarkerii acestei intoxicații.

De asemenea sunt menționate date din literatura de specialitate referitoare la tratamentul intoxicației cu plumb, cu enunțarea celor mai utilizate antidoturi cărora li se trec în revistă proprietățile fizico – chimice, datele farmacocinetice, reacțiile adverse, contraindicațiile și modul de administrare.

Deoarece în desfășurarea cercetărilor noastre am plecat de la ipoteza conform căreia flavonozidele ar putea constitui un antidot în intoxicațiile cu Pb și cu alte metale grele, prin formarea unor complecși care pot fi eliminați prin urină, cum era și firesc, am considerat necesar să verificăm considerentele pe care ne-am bazat.

1. Quercetolul și rutozida au proprietăți de antidot în intoxicațiile cu metale grele (Pb și Cd), unde acționează ca agent de chelatare și ca antioxidant.

2. Quercetolul prezintă o capacitate mai mare de complexare a plumbului decât rutozida.

3. Rutozida complexează cantități mai mari de Cd decât de Pb.

4. Valoarea constantei de stabilitate, mai mică de 10^6 , ne demonstrează instabilitatea complecșilor quercetolului cu Pb^{2+} , aceștia putându-se scinda în mediu acid. Coroborând aceste date cu posibilitatea eliminării complecșilor flavonoidici ai Pb^{2+} prin urină, considerăm că

alcalinizarea urinii ar mări stabilitatea acestora și ar permite epurarea Pb^{2+} din organism pe cale renală.

5. Combinațiile complexe ale quercetolului și rutinului obținute prin semisinteză prezintă valori scăzute ale conductivității electrice molare (sunt complecși din clasa neelectroliților).

De aici deducem că o formă solubilă de quercetol, care să-i respecte grupările – OH libere de la C – 3 și C – 5, ar fi cea mai convenabilă formă de antidot.

6. Acțiunea complexului Qcomplex asupra celulei vegetale (metoda fitobiologică, Constantinescu - testul *Triticum*) a demonstrat păstrarea caracterului citotoxic al plumbului și în compusul de eliminare al acestuia, în urma tratamentului cu quercetol (ca antidot).

7. Cercetările privind determinarea *in vivo* a efectului rutozidei asupra crustaceului *Euxinia maeotica* intoxicat cu clorură de cadmiu repartizat în mai multe loturi, au condus la concluzia că rutozida:

- nu modifică consumul de oxigen la crustaceele neintoxicate;
- dar reduce consumul de oxigen raportat la organismele expuse acțiunii toxicului; scade activitatea SOD;
- asigură o rată a supraviețuirii ridicată; crește sinteza proteinelor solubile; scade toxicitatea cadmiului prin complexarea sa.

8. Evaluarea *in vivo* a acțiunii quercetolului asupra moluștei *Mytilus galloprovincialis* intoxicată cu acetat de plumb a arătat creșterea consumului de oxigen (care credem că se datorează afectării enzimelor implicate în lanțul respirator),

v scăderea consumului de oxigen la moluștele intoxicate și tratate cu quercetol (presupunem că este determinată de anihilarea ionilor toxici prin formare de chelați, stabili, neionizabili);

v scăderea activității SOD (o atribuim efectului antioxidant al quercetolului);

v inhibarea ulterioară a catalazei printr-o expunere mai îndelungată la acțiunea plumbului, poate fi explicată prin prezența în structura catalazei a nucleul heminic.

Din literatură se știe că plumbul inhibă activitatea aminolevulinatdehidratazei, ceea ce înseamnă că afectează sinteza catalazei.

Rezultatele obținute ne determină să afirmăm că o parte din ionii de plumb au fost eliminați sub formă de complecși ai quercetolului.

9. Determinarea efectului antidotic ne-a condus la concluzia că doza unică administrată din substanța cercetată are o valoare suficient de mică ($70\mu\text{moli/Kg m.c.}$) astfel încât nu a influențat acțiunea toxicului (acetat de plumb) prin propria toxicitate, iar raportul de bioinactivare acetat de plumb-quercetol (2,18) și indicele de protecție (1,43), ceea ce demonstrează o eficiență terapeutică reală.

10. Efectul quercetolului asupra șobolanilor intoxicați cu acetat de plumb s-a evaluat prin

v creșterea biosintezei hemului (ca urmare a scăderii permeabilității, creșterii rezistenței hematiilor și eliminării ionilor de Pb^{2+});

▼ scăderea concentrației ionilor de plumb excretați prin urină (evident la administrarea quercetolului în concentrație 0,05 g/Kg comparativ cu administrarea acestuia în concentrație de 0,1 g/Kg);

Acțiunea quercetolului asupra activității catalazei și a SOD se manifestă astfel:

▼ la animalele tratate cu quercetol activitatea catalazei și a SOD este mai mică decât la martor, fapt atribuit proprietăților antioxidante ale flavonolilor;

▼ animalele intoxicate și tratate cu quercetol prezintă o ușoară scădere a activității catalazice față de martor și de martorul intoxicat;

▼ quercetolul singur, administrat animalelor intoxicate influențează neconcludent activitatea SOD;

▼ quercetolul administrat animalelor neintoxicate induce o scădere a activității SOD, probabil ca urmare a proprietăților sale reducătoare.

▼ Afectarea tubilor contorți proximali și distali, cu apariția macrofagelor cu plumb, a eritrocitelor modificate, instalarea degenerescenței tubilor renali și începutului de scleroză (examen histopatologic) le atribuim ionilor de plumb neeliminați, dar nu excludem și posibile reacții adverse ale quercetolului.

11. Pe baza raportului de bioinactivare și a indicelui de protecție presupunem că produsele farmaceutice conținând quercetol și rutozidă ar putea constitui un foarte bun remediu antidot în intoxicația cu metale grele, în special cu plumb.

12. Procesul tehnologic de laborator privind obținerea unui extract flavonozidic selectiv **din *Sophorae flores*** denumit "**Extractum Sophorae**" este reproductibil.

13. Metodologia de control al calității produsului "**Extractum Sophorae**" este accesibilă oricărui laborator de fitochimie și biochimie.

14. "**Extractum Sophorae**" semifabricat are un conținut de 4,90 -5,20 g% agliconi flavonici exprimați în quercetol, 6,8 g% polifenoli totali exprimați în echivalenți de quercetol, o activitate antioxidantă de $20,36 \pm 0,91$ mM Trolox/g extract și sunt lipsite de toxicitate.

15. Rezultatele analizei de corelație și regresie efectuată în scopul stabilirii corelației dintre conținutul în polifenoli totali și capacitatea antioxidantă sugerează că 83% din capacitatea antioxidantă a celor 3 extracte luate în studiu rezultă din contribuția compușilor polifenolici.

De asemenea se poate conchide că activitatea antioxidantă a acestor extracte nu se limitează numai la compușii polifenolici, ea putând fi imprimată și de alți constituenți chimici, în cazul nostru de izoflavone pe care nu le-am putut decela (în lipsa substanțelor de referință), sau a calconelor rezultate din scindarea inelului pironic al flavonelor.

16. Optimizarea procesului tehnologic de laborator s-a realizat cu ajutorul unui plan Box – Wilson, urmărind influența timpului de hidroliză și a raportul optim produs vegetal-solvent prin conținutul în polifenoli totali și a capacitatea antioxidantă. S-a stabilit raportul optim produs vegetal/solvent = 1/9,25, timpul de hidroliză de 18 ore.

17. Validarea procesului tehnologic s-a bazat pe rezultatele obținute la prepararea a 3 șarje de extract (cantitate de extract similară, conținut în quercetol apropiat).

18. Cercetările privind stabilitatea extractului au constatat în dozarea flavonolilor la intervale de 3, 6, 9 luni. Ele trebuie urmărite în continuare la intervale de 18, 24 și 36 luni. Pierderile înregistrate în timpul conservării se încadrează în limitele admise de FR X ($\pm 5\%$).

19. Studiile privind toxicitatea extractului, efectuate pe șobolani Wistar prin administrarea de doză unică (3000 mg/Kg m.c.) au arătat că extractul este lipsit de toxicitate, flavonele fiind de altfel destul de mult folosite în tratarea fragilității capilare.

20. Extractul flavonozidic standardizat obținut a putut fi ușor prelucrat sub forma unor comprimate neacoperite de uz oral.

21. Procesul tehnologic de laborator privind prepararea comprimatelor și formula propusă s-au dovedit adecvate.

22. Comprimatele obținute din acest semifabricat (100 mg/comprimat) corespund cerințelor de calitate prevăzute în FR X și Farmacopeea Europeană.

Deoarece timpul afectat stagiului de doctorat nu permite rezolvarea tuturor problemelor legate de alcătuirea dosarului de înregistrare a unui nou produs farmaceutic, ne-am oprit cu cercetările în acest stadiu și ne propunem continuarea lor cu studii privind:

1. optimizarea procesului tehnologic de obținere a extractului (semifabricat) și a produsului farmaceutic;

2. determinarea stabilității extractului și a perioadei de valabilitate a formei farmaceutice în condiții de conservare normale (sub 25°C) și de stres (40°C și umiditate 60%);

3. studii de biodisponibilitate și de experimentare clinică.

Bibliografie selectivă

1. Abrahamse S. L., Kloots W. J, van Amelsvoort J. M. M. - Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat, *Nutrition Research*, 2005, **25** (3), 243 - 249.

4. Alexa I. D., Mihalache I. L., Panaghiu L., Palade F. – Chronic lead poisoning – a forgotten cause of anemia, *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat.*, Iași, 2002, 106 (4), 825 – 8.

5. Alderborn G., Nyström C., Bolhuis G. K. - Materials for direct compaction. *Pharmaceutical Powder Compaction Technology*. New York, NY: Marcel Dekker Inc; 1996, 419 - 478.

6. Ambrose T., Muhammad L., Scott M. - Bone lead concentrations assessed by in vivo X-ray fluorescence, *Clinical Chemistry*, 2000, **46** (8), p. 1171 - 1178.

10. Anjaneyulu M., Chopra K., Kaur I. - Antidepressant activity of quercetin, a bioflavonoid, in streptozotocin – induced diabetic mice, *J. Med. Food*, 2003, **6** (4), 391 – 5.

11. Ancuceanu R., Istudor V., Dinu M., Codreanu M. V. – Contributions to the study of some *Cuscuta* species. Note 1. Study of the correlations between the metabolism of *Cuscuta capestris* Yunck and its hosts, by the Constantinescu bioassay (*Triticum test*), *Farmacia*, 2005, **53** (4), 28 – 38.

12. Ancuceanu R. – Corelații între metabolismul unor specii de *Cuscuta* indigene și metabolismul gazdelor lor în scopul precizării speciei cu cel mai mare potențial citostatic, Teză de doctorat, U. M. F. "Carol Davila București, 2006. 52.

16. Balcerzak M., Kopacz M., Kosiorek A., Swiecicka E., Kus S. - Spectrophotometric studies of the interaction of noble metals with quercetin and quercetin - 5' – sulfonic acid, *Analytical Sciences*, 2004, **20**, 1333 – 1337.

17. Baldwin D., Marshall W. - Heavy metal poisoning and its laboratory investigation, *Ann. Clin. Biochem.*, 1999, **36**, 267 - 300.

154. Istudor V. - Farmacognozie, Fitochimie, Fitoterapie, Editura Medicală, București, 1998, vol.1, p. 145 – 170.

155. Istudor V., Nacea V., Uivarosși V., Roncea F. – Cercetări preliminare privind obținerea unui eventual antidot în intoxicațiile cu metale grele, a X a Sesiune de Comunicări Științifice a Facultății de Medicină și Farmacie, 6 - 8 aprilie 2000, Carte de rezumate, p. 269 – 270.

156. Istudor V., Sava C., Roncea F. - Cercetări preliminare privind obținerea unor antidoturi în intoxicațiile cu metalele grele, Sesiunea de comunicări științifice, 6-7 aprilie 2001, Constanța; p. 154.

157. Istudor V. - Farmacognozie, Fitochimie, Fitoterapie, Editura Tehnoplast Company SRL, București, 1996, vol.1, p. 150 – 155.

204. Lurdes M., Fernandez, M. T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M. H., Jennings, K. R., - Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity, *Free Radical Research*, 2002, **24** (7), 1 – 10.

306. Roncea F., Negreanu-Pirjol T., Bratu M., Istudor V., Dobrină S., Birghilă S. -Use of flavonoid structures as antitoxic agents against heavy metals contamination; obtaining and characterization of complexes metal-flavonoids, Second International Symposium on Trace Elements and Minerals in Medicine and Biology, Munchen, 2004, abstract book, p.151.

307. Roncea F. Istudor V., Bucur L., Doroftei E., Arcuș M. – Researches concerning the obtaining of an antidote in lead poisoningI. The Constantinescubioassay (*Triticum test*) of quercetol – Pb complex, Congresul Național de Farmacie, ed. a XIII a, 28 – 30 09.2006, Cluj – Napoca, Carte de rezumate, p. 174.

308. Roncea F., Istudor V., Bratu M. M. Pîrjol T. - Rolul protector al rutozidei asupra moluștei *Mytilus galloprovincialis* intoxicată cu plumb, *Farmacia*, 2003, **40** (2), 55 - 60.

309. Roncea F., Istudor, V., Bratu M. M., Pîrjol T. - Rolul antitoxic al quercetolului asupra moluștei *Mytilus galloprovincialis* intoxicată cu plumb, *Revista de Medicină și Farmacie*, 2004, **50**, Supliment II, Târgu – Mureș, 271 - 274.