



UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI”

CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FIZICĂ



**APLICAȚII ALE SPECTROSCOPIEI DE REZONANȚĂ
ELECTRONICĂ DE SPIN (RES) ÎN STUDIUL UNOR
ALIMENTE ȘI A UNOR COMPUȘI DE INTERES
FARMACEUTIC**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător științific:

Prof. univ. dr. Grigore DAMIAN

Doctorand:

Ioan Csillag

**Cluj-Napoca
2015**

Mulțumiri

A termina un Doctorat este un adevărat maraton, și nu aș fi ajuns la sfârșitul acestei călătorii fără ajutorul și sprijinul anumitor persoane de-a lungul acestor șapte ani.

În primul rând vreau să mulțumesc domnului Prof. Univ. Dr. Grigore Damian, atât în calitate sa de îndrumător științific cât și de susținător moral în finalizarea acestei teze, domnia sa punându-mi la dispoziție atât cunoștințele și experiența sa, cât și un material bibliografic personal foarte prețios. Datorită dumnealui am avut ocazia de a participa la manifestările științifice din domeniu, sugestiile pe care mi le-a dat și discuțiile dese au condus la îmbunătățirea permanentă a redactării tezei.

Îmi mulțumesc de asemenea pentru înțelegerea și căldura cu care m-a călăuzit pentru generozitatea, răbdarea, profesionalismul și încrederea cu care m-a îndrumat în demersurile științifice întreprinse, în special pentru inițierea mea în "tainele" spectroscopiei RES.

În continuare, doresc să îmi exprim gratitudinea față de membrii comisiei de evaluare a lucrării pentru sfaturile și sugestiile oferite. Doresc să mulțumesc în mod special domnului Prof. univ. dr. Aurel Pop (Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca) care mi-a făcut onoarea să accepte să fie președintele comisiei de doctorat. De asemenea, doresc să mulțumesc membrilor comisiei de referenți, doamnei Prof. univ. dr. Dorina Creangă (Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași), doamnei Conf. univ. dr. Nicoleta Vedeanu (Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca) și domnului Prof. univ. dr. David Leontin (Universitatea „Babeș-Bolyai”, Cluj-Napoca) pentru toate sfaturile pertinente și constructive, oferite pe perioada corectării tezei de doctorat.

Le mulțumesc persoanelor care dau un sens vieții mele, ficei mele, fiului meu, soției mele și părinților mei, care au avut răbdarea de a-mi suporta absența, pentru încrederea în mine, dragostea lor și permanenta încurajare.

În încheiere mulțumesc tuturor, care mi-au dăruit cu dărnicie din cunoștințele lor și care au clădit în mine dragostea și respectul pentru muncă, insuflându-mi curiozitatea vie și curajul de a căuta mereu adevărul.

CUPRINS

	Pag.
INTRODUCERE	4
1. PRINCIPII ALE (RES)	6
1.1. Aspecte generale ale spectroscopiei RES	6
1.2. Hamiltonianul de Spin	6
1.2.1. Interacțiunea Zeeman	6
1.2.2. Interacțiunea Zeeman electronică	7
1.2.3. Interacțiunea Zeeman nucleară	7
1.2.4. Interacțiunea hiperfină	7
1.2.5. Interacțiunea superhiperfină	8
1.2.6. Interacțiunea electronică spin-spin	8
1.3. Fenomenele de saturație și relaxare	8
1.3.1. Fenomenul de saturație	9
1.3.2. Relaxarea spin – rețea	10
1.3.3. Relaxarea spin – spin	10
1.4. Tehnica experimentală RES	11
Referințe bibliografice	12
2. METODE RES ÎN STUDIUL RADICALILOR LIBERI ȘI A ANTIOXIDANȚILOR	13
2.1. Radicalii liberi	13
2.1.1. Clasificarea și caracterizarea generală a radicalilor liberi	13
2.1.2. Generarea radicalilor liberi	14
2.1.3. Mecanisme principale de formare a radicalilor liberi	14
2.2. Antioxidanții	16
2.3. Metode specifice ale spectroscopiei RES în studiul radicalilor liberi și a antioxidantilor	16
2.3.1. Metoda marcherilor de spin („spin label”)	16
2.3.2. Metoda capcanelor de spin („spin traps”)	17
Referințe bibliografice	20
3. ANALIZA CALITĂȚII UNOR ALIMENTE VEGETALE PRIN SPECTROSCOPIE RES	21
3.1. Caracteristici calitative ale alimentelor și metode de analiză	21
3.2. Studiul prin Spectroscopiei de Rezonanță Electronică de Spin (RES) a unor alimente	21
3.2.1. Elemente de bază și specifice aplicației spectroscopiei RES	21
3.2.2. Caracterizarea unor alimente vegetale cultivate în mediu organic și în seră prin spectroscopiei RES	23
3.2.2.1. Condiții de sol în cultivarea unor produse alimentare	23
3.2.2.2. Caracterizarea fructelor de căpșuni	23
3.2.2.3. Caracterizarea tomatelor și a ardeilor	25
Referințe bibliografice	27
4. STUDIUL RES AL UNOR COMPUȘI DE INTERES FARMACEUTIC	28
4.1. Aspecte generale privind aplicarea spectroscopiei RES în studiul compușilor de interes farmaceutic	28
4.2. Studiul activității antioxidante ale unor extracte din plante farmaceutice	28
4.2.1. Prepararea probelor și determinarea conținutului de polifenoli	29
4.2.2. Analiza caracteristicilor antioxidante	30
4.3. Studiul efectelor radiațiilor gamma asupra unor medicamente	31
Referințe bibliografice	35
CONCLUZII	36

INTRODUCERE

Paramagnetismul este o proprietate a materialelor care au momente magnetice proprii și care în lipsa unui câmp magnetic extern sunt orientate aleator și nu se manifestă la nivel macroscopic. Însă sub influența unui câmp magnetic exterior, aceste momente elementare se orientează în direcția câmpului și ca urmare nivelele energetice proprii se despică (efect Zeeman).

Această tehnică este capabilă să furnizeze detalii de structură moleculară inaccesibile altor metode analitice. Aceasta se datorează faptului că momentul magnetic de spin al electronului neîmperecheat este foarte sensibil la câmpurile magnetice locale din interiorul probei. Câmpuri magnetice locale, de obicei provin de la momentele magnetice nucleare ale variațiilor momentelor magnetice ale unor centri care pot fi prezenți în vecinătăți și pot furniza o serie de informații interpretabile asupra structurii și dinamicii unui sistem atomic sau molecular.

Posibilitatea detectării unor cantități extrem de mici de centri paramagnetici, face ca tehnica RES să fie extrem de utilă în studiul radicalilor liberi în chimie, ionilor paramagnetici în chimia fizică, diferitelor efecte biochimice și biofizice în medicină și fiziologie.

În lucrarea de față s-a încercat extinderea aplicațiilor tehnicilor RES și a unor metode specifice în studiul caracterizării unor alimente vegetale (căpșuni, tomate și ardei) și a unor compuși de interes farmaceutic, plecând de la trei deziderate de cercetare care pot fi abordate prin această metodă spectroscopică;

- detectia și caracterizarea centrilor paramagnetici ai microelementelor prezenți în alimente vegetale și extrase farmaceutice
- caracterizarea activităților antioxidante corelat cu capacitatea acestora de reducere a radicalilor liberi
- studiul efectelor radiației gamma asupra unor produse de natură alimentară sau a unor compuși farmaceutici.

Lucrarea este structurată pe patru capitole, în încercarea de a aborda unele aplicații ale spectroscopiei RES în aceste direcții de cercetare.

În **Capitolul 1**, sunt prezentate elemente fundamentale ale spectroscopiei RES plecând de la bazele fizice ale fenomenului de rezonanță electronică și a modului de interpretare teoretică a acestuia. Sunt prezentate deasemeni unele elemente de tehnică spectroscopică în studiile de detecție și caracterizare a sistemelor paramagnetice. Sunt reliefate principalele elemente tehnice

și metodologice specifice aplicării spectroscopiei RES în studiul radicalilor liberi din sistemele biofarmaceutice.

Capitolul 2 al lucrării este consacrat prezentării și caracterizării radicalilor liberi și a antioxidanților și a tehnicilor specifice de studiu a acestora, prin Rezonanță Electronică de Spin folosind capcanele de spin și radicalii nitroxidici. Radicalii liberi pot fi detectați *direct*, datorită capacității lor scăzute de recombinație iar în cazul radicalilor liberi din sisteme din fază gazoasă sau lichidă, detecția se face prin metode *indirecte*, datorită timpului de viață foarte scurt (de ordinul microsecundelor) al acestora. Despicarea hiperfină din spectrul RES al spin aductului, oferă informații calitative și cantitative asupra radicalului inițial captat. Prin utilizarea radicalilor nitroxidici și a altor radicali stabili, este posibilă analiza diferitelor sisteme, oferind informații valoroase în studiul sistemelor ordonate, studiul dinamicii moleculare în sisteme amorfе și sisteme biologice, studiul fenomenelor de interfață în sistemele coloid sau analiza caracterului antioxidant al unor alimente vegetale, extrase farmaceutice, vitamine, minerale și alți compuși fotochimici.

În **Capitolul 3**, al tezei sunt prezentate rezultatele experimentale ale aplicării spectroscopiei RES în caracterizarea unor alimente vegetale cultivate în mediu organic și în seră. Sunt analizate fructele de căpșuni, tomate și ardei gras. Au fost reliefate principale aspecte ale spectrelor RES ale probelor liofilizate și au fost identificate elementele care pot constitui amprente ale celor două moduri de cultivare și anume schimbările în componente principale ale centrilor paramagnetici, adică fier, mangan și radicali liberi nativ-semiquinone. Deasemeni sunt prezentate evaluări ale activității antioxidante ale sucurilor proaspete ale acestor probe de alimente vegetale.

Capitolul 4 prezintă rezultate ale aplicării spectroscopiei RES în studiul unor compuși de interes biomedical. Acest capitol are două componente și anume (i) studiul activității antioxidante a extractelor de trei plante medicinale cunoscute ca având potențial terapeutic și anume *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* și *Teucrium chamaedrys* și (ii) studiul efectele radiației gamma asupra medicamentelor *Purinetol*, *Atenolol* și *Pindolol*, cu scopul determinării și cuantificării efectelor induse de radiație în structura acestora.

În finalul tezei sunt prezentate **Concluziile** studiilor experimentale cuprinse în această lucrare privitoare la unele aplicații ale spectroscopiei RES în analiza probelor.

1. PRINCIPII ALE SPECTROSCOPIEI DE REZONANȚĂ ELECTRONICĂ DE SPIN (RES)

1.1. Aspecte generale ale spectroscopiei RES

Tehnica spectroscopică RES are la bază tranzițiile induse între nivelele Zeeman ale unui sistem paramagnetic aflat într-un câmp magnetic static. Gradul de desplicare și natura tranzițiilor induse, sunt dependente de structura sistemului paramagnetic și de valoarea câmpului magnetic extern.

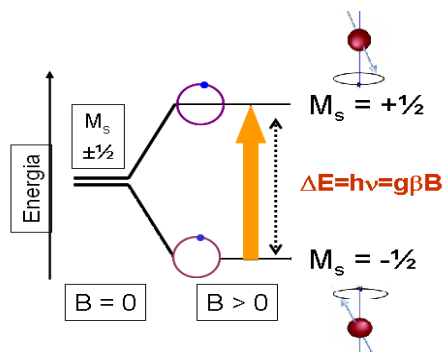


Fig. 1.1. Reprezentarea schematică a desplicării nivelelor energetice în câmp magnetic.

1.2. Hamiltonianul de Spin

Spectrele RES pot reflecta diferite interacțiuni magnetice, însă toate acestea provin de fapt din interacțiuni între perechi de magneți de trei tipuri: spini electronici, spini nucleari și magneți de laborator. Astfel, în moleculă, electronul, caracterizat de un moment magnetic, nu este izolat, el aflându-se într-un mediu ce conține sarcini și momente magnetice ce produc câmpuri electrice și magnetice în jurul său. Interacțiunea electronului cu aceste câmpuri este descrisă de Hamiltonianul de spin efectiv.

1.2.1. Interacțiunea Zeeman

Metoda RES constă în studiul tranzițiilor induse între două subnivele Zeeman vecine, sub acțiunea unui câmp de microunde cu o anumită frecvență numită frecvență de rezonanță [8]. Diferența de energie în spectroscopia RES este datorată interacțiunii electronilor neîmperecheați din probe cu câmpul magnetic, efect denumit *efect Zeeman*.

Spectrul de absorbție măsurat la condiția de rezonanță este schematic reprezentat în partea de jos a figurii.

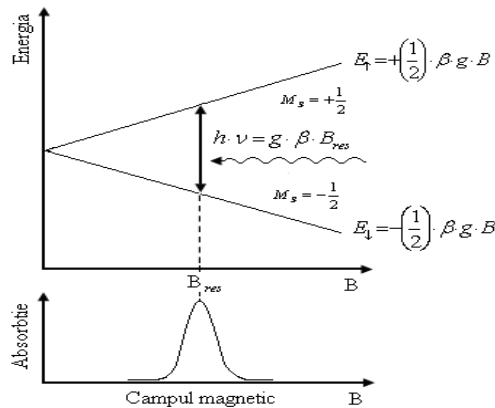


Fig. 1.2.1. Nivelele energetice și absorbția de rezonanță RES pentru interacția Zeeman a unui electron ($S = 1/2$)

1.2.2. Interacțiunea Zeeman electronică

Cea mai simplă formă a hamiltonianului de spin este pentru un singur electron cu g izotrop. Hamiltonianul poartă numele de hamiltonian Zeeman electronic, acest termen descriind interacțiunea spinului electronic cu câmpul magnetic aplicat. În sisteme chimice reale, electronul este însă asociat cu cel puțin un atom astfel că hamiltonianul va avea o formă mai complexă.

1.2.3. Interacțiunea Zeeman nucleară

Așa cum momentul cinetic de spin electronic interacționează cu câmpul magnetic aplicat, momentul cinetic de spin nuclear I va interacționa cu câmpul magnetic aplicat [11], aducând hamiltonianului de spin la forma:

$$\hat{H}_{ZN} = -g_N \cdot \mu_N \cdot B_0 \cdot \hat{I} \quad (1.2.3.1.)$$

în care g_N și μ_N reprezintă factorul g nuclear respectiv magnetonul Bohr nuclear. Factorul g_N poate avea atât valori pozitive (proton) cât și valori negative, cum este în cazul ^{15}N . Magnetonul Bohr nuclear poate fi neglijat în cadrul spectroscopiei RES deoarece are o valoare mult mai mică decât valoarea magnetonului Bohr electronic.

1.2.4. Interacțiunea hiperfină

Interacțiunea dintre momentul magnetic de spin și un moment magnetic nuclear al unui nucleu vecin, se numește interacțiune hiperfină [12, 13].

Partea izotropică a interacțiunii hiperfine, poate fi extrasă direct din spectrele RES în fază lichidă, oferind informații asupra distribuției densității de spin a spinului electronic. Partea anizotropică conține informații despre distanța dintre spinii electronic și nuclear precum și

orientarea acestora față de câmpul magnetic aplicat. Această interacțiune poate fi uneori mediată în lichide, în timp ce în solide se determină din analiza spectrelor experimentale. Asemeni factorului g , în soluții, factorul A conține informații legate de polaritatea și proticitatea micromediului din vecinătate.

1.2.5. Interacțiunea superhiperfină

Interacțiunea superhiperfină sau hiperfină de ligand se datorează interacțiunii dintre momentul magnetic de spin și un moment magnetic nuclear al unui nucleu vecin (I_i) sau a influenței mai multe seturi de nuclee echivalente ($2nI_i + 1$).

Ca urmare, a acestei interacțiuni apar despicări suplimentare în spectrul RES și care sunt utile în obținerea de informații asupra covalenței sistemului molecular.

1.2.6. Interacțiunea electronică spin-spin

Considerând un sistem cu doi sau mai mulți electroni, Hamiltonianului de spin i se mai adaugă un termen care caracterizează interacțiunile electronice spin-spin. Interacțiunile între sisteme de spin diferite pot fi de două tipuri:

- interacțiuni dipol-dipol care sunt semnificative doar la distanțe mari fiind interacțiuni relativ slabe, acestea sunt caracterizate de tensorul de cuplaj dipolar D
- interacțiuni de schimb care apar la distanțe mici, de ordinul legăturilor interatomice, fiind interacțiuni mai intense cu câteva ordine de mărime decât cele dipolare și sunt caracterizate de tensorul de cuplaj de schimb J

Interacțiunea dipolară determină despicări suplimentare chiar și în absența unui câmp magnetic extern, numindu-se și interacțiune în câmp nul, sau interacțiune fină. Hamiltonianul interacțiunii, pentru sistem de spini puternic cuplați.

1.3. Fenomenele de saturație și relaxare

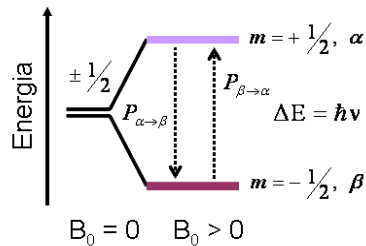
La echilibru termic, probabilitatea de a induce o tranziție este proporțională cu populația stărilor (distribuție Boltzmann).

Populațiile celor două nivele de energie sunt aproape egale, dar un ușor exces pentru nivelul inferior ceea ce duce la absorbția de energie. Pentru a menține un exces de populație la nivelul inferior, electronii de la nivelul superior pierd o cuanta de energie $h\nu$ pentru a reveni la nivelul inferior (se satisface legea Maxwell-Boltzmann). Aplicând o radiație de microunde are loc o absorbție de energie iar probabilitățile de tranziție pentru absorbție și emisie stimulată sunt egale, atunci populațiile își vor modifica valorile de echilibru.

Forma liniilor din spectrele RES, furnizează o serie de informații cu privire la viteza proceselor analizate. Astfel, lărgimea liniilor spectrale se datorează scăderii componentei vectorului magnetizare în plan perpendicular. Aceste mecanisme de disipare a energiei, reflectă faptul că, spinii nucleari nu sunt în echilibru termic cu mediul, iar revenirea la starea de echilibru are loc printr-un proces de relaxare într-un anumit interval de timp.

1.3.1. Fenomenul de saturație

Fenomenul de saturare are loc atunci când excitarea stărilor de către puterea câmpului de microunde este mai rapidă decât viteza de relaxare.



La echilibru termic, probabilitățile de tranziție pentru absorbție și emisie stimulată (P) sunt egale (coef. Einstein).

Amplitudinea semnalului funcție de puterea de microunde, va depinde tipul de proces de relaxare, cum este prezentat în Figura 1.3.1.1.

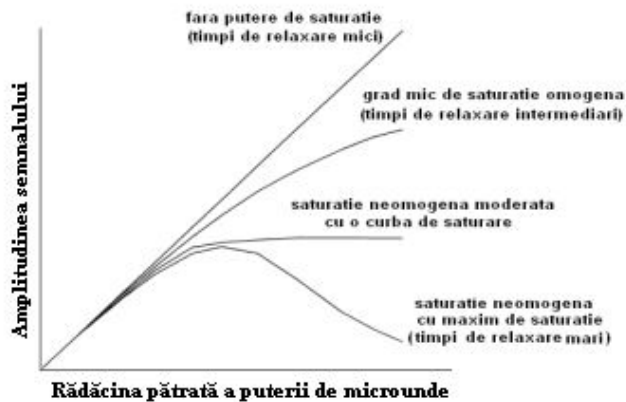


Fig. 1.3.1.1. Dependența amplitudinii semnalului RES de natura proceselor de relaxare

Determinarea efectului de saturație cu creșterea puterii de microunde, oferă informații asupra proprietăților de relaxare a sistemului. Dacă câmpul magnetic de microunde are o amplitudine suficient de mare și este la frecvența de rezonanță, cele două nivele energetice au populații aproximativ egale și absorbția de microunde scade aproape la zero, fiind îndeplinită așa numita condiție de saturație (Figura 1.3.1.2).

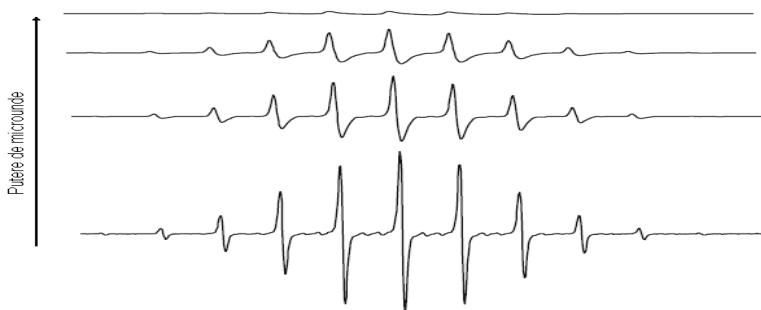


Fig. 1.3.1.2. Amplitudinii semnalului RES în procesul de saturare

1.3.2. Relaxarea spin – rețea

Relaxarea spin-rețea este produsă de fluctuațiile câmpului magnetic local datorate mișcării moleculelor. În acest proces excesul de energie este transmis moleculelor înconjurătoare sub forma de căldură datorită mișcării moleculare în cazul lichidelor și gazelor și al vibrațiilor atomilor în rețelele solide. Aceste fluctuații pot stimula schimbarea populării stărilor către echilibru, astfel încât magnetizarea din planul perpendicular revine la valoarea de echilibru M_0 după un timp T_1 , numit timp de relaxare spin-rețea. Acest proces implică interacțiunea dintre sistemul de spini și moleculele din jur (energia este disipată în rețea ca energie de vibrație, rotație sau translație) și este caracterizată de un timp de relaxare T_1 .

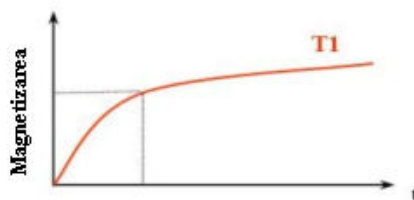


Fig. 1.3.2.1 Curba de relaxare spin-rețea

După cum se vede în Fig. 1.3.2.1, o valoare mare a timpului de relaxare conduce la o lărgire a benzilor de absorbție, în timp ce unul prea scurt conduce la scăderea în intensitate a benzilor de absorbție.

1.3.3. Relaxarea spin – spin

Procesul de relaxare spin-spin este determinat de distribuția spinilor din planul perpendicular, în cazul când aceștia procesează cu viteze diferite. Datorită scăderii magnetizării în intervalul de timp T_2 , linia spectrală se lărgeste, lărgimea la semiînălțime va fi: $\Delta\nu=1/T_2$ (măsură a vitezei procesului) așa cum este reprezentat în Figura. 1.3.3.1.

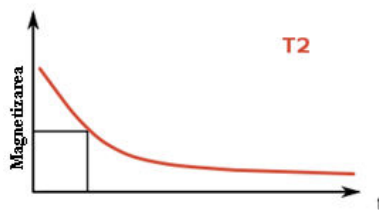


Fig. 1.3.3.1 Curba de relaxare spin-spin

Relaxarea spin-spin (sau transversală) constă în repartizarea energiei între nucleele vecine ca urmare a interacției spin-spin și este caracteristică solidelor, fiind aproape neglijabilă în cazul lichidelor, datorită mișcării termice a moleculelor.

1.4. Tehnica experimentală RES

O reprezentare generală a unui spectrometru RES cu principalele componente, este prezentată în Figura 1.4.1.

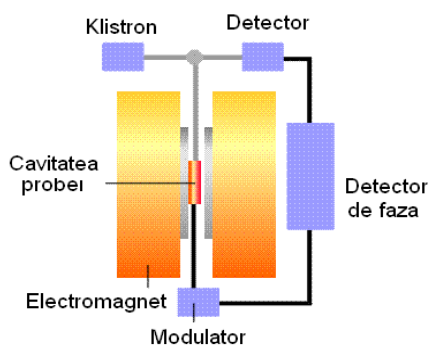


Fig. 1.4.1. Schema generală a unui spectrometru RES

Funcționarea spectrometrului se bazează pe înregistrarea într-un câmp magnetic static al polarizării induse de o probă electromagnetică în câmp de microunde datorită tranzițiilor cuantice între nivelele Zeeman ale particulelor paramagnetice. Astfel, un spectrometru RES se compune dintr-un electromagnet capabil să creeze un câmp magnetic static B , un generator de microunde, un detector, o cavitate de microunde și un sistem computerizat pentru înregistrarea și observarea fenomenului de rezonanță. Toate aceste elemente se găsesc cuplate prin intermediul probei de studiat care se află sub acțiunea câmpului magnetic static și al câmpului de microunde.

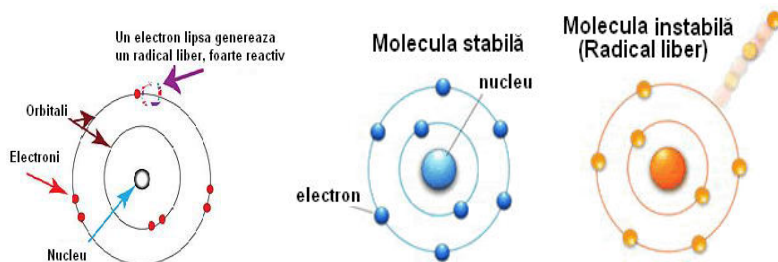
Bibliografie selectivă

1. J.A.Weil, J.R.Bolton, J.R. Wertz, *Electron Paramagnetic Resonance Theory and Practical Applications*, Wiley, New York, (1994)
2. R.V.Parish, *NMR, NQR, EPR, and Mossbauer Spectroscopy in Inorganic Chemistry*, Ellis Horwood, New York, (1990)
3. Abragam A. & Bleaney B. *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions*. Clarendon Press Oxford, (1970)
4. Wertz J. & Bolton J. *Electron Spin Resonance. Elementary Theory and Practical Applications*. Chapman and Hall, New York, London, (1986)
5. G. M. Rosen, Britigan B. E., Halpern H. J. & Pou S. *Free Radicals: Biology and Detection by Spin Trapping*. Oxford University Press, New York, (1999)
6. M. A. Hemminga and L. J. Berliner, *ESR Spectroscopy in Membrane Biophysics*, Springer Science+ Business Media, 27 (2007)
7. M. Brustolon and E. Giamello, *Electron Paramagnetic Resonance: A Practitioner's Toolkit*, John Wiley & Sons, Inc., (2009)
8. I.Ursu, *Rezonanța electronică de spin*, Editura Academiei R.S.România, (1965)
9. E. Bordignon and H.-J. Steinhoff, *Membrane protein structure and dynamics studied by site-directed spin labeling ESR*, in M.A. Hemminga and L.J. Berliner (eds.) *ESR Spectroscopy in Membrane Biophysics*. Springer Science and Business Media, New York, (2007)
10. L. David, O. Cozar, C. Crăciun, V. Chiș, *Rezonanță electronică de spin – principii, metode, aplicații*, Editura Presa Universitară Clujeană, Cluj Napoca, (2001)
11. M. Brustolon and E. Giamello, *Electron Paramagnetic Resonance: A Practitioner's Toolkit*, John Wiley & Sons, Inc., (2009)
12. P.H.Rieger, *Electron Spin Resonance. Analysis and Interpretation*, RCS Publishing, (2007)
13. G. Likhtenshtein, J. Yamauchi, S. Nakatsuji, A. I. Smirnov, and R. Tamura, *Nitroxides: Applications in Chemistry, Biomedicine and Materials Science*, Wiley-VCH, (2008)

2. METODE RES ÎN STUDIUL RADICALILOR LIBERI ȘI A ANTIOXIDANȚILOR

2.1. Radicalii liberi

Radicalii (denumiți și radicali liberi) sunt specii chimice (atom, molecula sau ion) care posedă un electron neîmperecheat în stratul exterior al învelișului electronic, motiv pentru care sunt foarte reactivi chimic determinând instabilitatea atomului/moleculei care îi conțin.



Radicalii liberi apar în anumite sisteme biologice sau chimice, în reacții de oxido-reducere în care au loc modificări structurale mari, în urma cărora substanța respectivă își schimbă adesea funcția biologică (devine mai hidrosolubilă sau intervine în alt lanț de reacții metabolice).

2.1.1. Clasificarea și caracterizarea generală a radicalilor liberi

Clasificarea radicalilor se poate face după diverse criterii: timpul de viață și natura elementului care conține electronul neîmperecheat, după tipul de simetrie orbitală a radicalului sau după natura acestora. O astfel de clasificare care să includă marea majoritatea radicalilor ar fi următoarea [1]:

A. După timpul de viață:

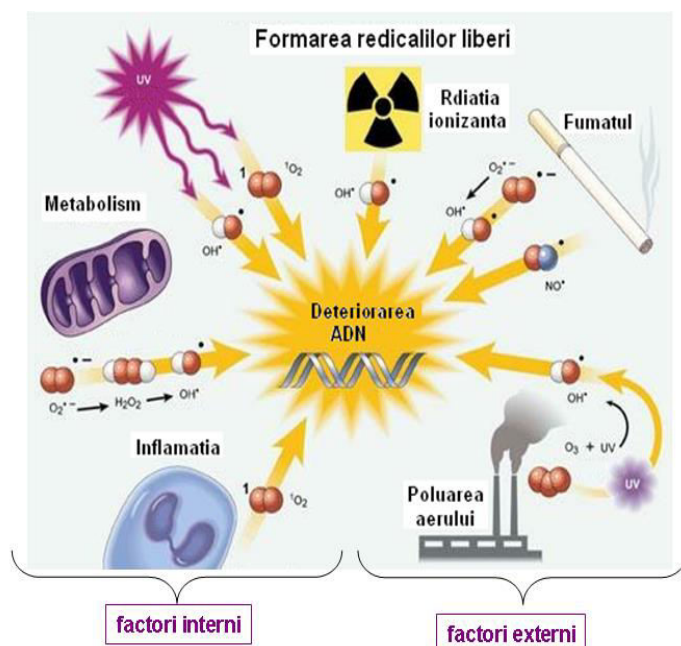
- radicali stabili;
- radicali persistenti;
- radicali tranzienți.

B. După natura radicalului:

- radicali ai oxigenului;
- radicali ai azotului;
- compuși aromatici;
- compuși de tip chinonic și semichinonic;
- acizi nucleici;
- radicalul tiol.

2.1.2. Generarea radicalilor liberi

Generarea radicalilor liberi în sisteme biologice are loc ca urmare a acțiunii unor factori interni și externi și pe care mecanismele naturale ale entității biologice nu le pot controla. În esență, aceștia sunt produși de acțiunea a două categorii de factori și anume factori interni și factori externi. O reprezentare schematică este prezentă în schema de mai jos [2]:



2.1.3. Mecanisme principale de formare a radicalilor liberi

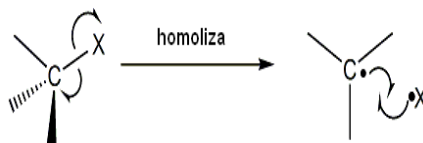
Există o serie de procese mai mult sau mai puțin complexe prin care se pot genera radicali liberi. Astfel, radicalul liber se formează ușor atunci când o legătură covalentă este ruptă și un electron rămâne cu fiecare atom nou format, proces numit scindarea legăturii. În funcție de tipul legăturilor covalente (nepolare sau polare) din reactanți dar și de natura substratului și condițiile de reacție (mediu polar sau nepolar, stare gazoasă sau soluție, temperatură, lumină) legăturile din reactant se pot scinda homolitic sau heterolitic.

Principalele procese de generare a radicalilor în sistemele organice și anorganice, pot fi rezumate în:

- homoliză;
- fotoliza și radioliza;
- reacțiile enzimatic;
- metabolizarea.

Homoliza

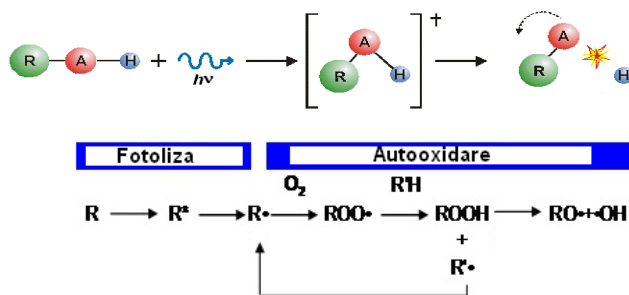
Prin scindarea homolitică a unei legături covalente, o moleculă este fragmentată în două, fiecare fragment păstrând unul dintre electronii pereche.



Scindarea homolitică apare mai puțin frecvent în sistemele biologice, deoarece necesită o cantitate mare de energie, sursa fiind fie lumina ultravioletă, fie căldura sau radiațiile ionizante.

Fotoliza și radioliza

Procesul de *fotoliză și radioliză* este caracterizat de scindarea uneia sau mai multor legături covalente ca urmare a absorbției radiației electromagnetice și formare de specii reactive (radicali liberi):



Reacțiile enzimatice

Enzimele sunt catalizatori organici produși de celula vie acționând asupra anumitor substanțe numite substraturi. În marea lor majoritate, enzimele catalizează reacția unei substanțe organice cu un compus anorganic liber sau cedat de alt compus organic (apa, acid fosforic, hidrogen, oxigen, etc.). Reacțiile enzimatice din organism dau naștere la radicali liberi intermediari care reacționează între ei sau cu alte substanțe formând compuși stabili.

Metabolizarea

Metabolismul reprezintă totalitatea transformărilor biochimice și energetice ce au loc în țesuturile organismelor vii. Radicalii liberi apar în cele mai multe celule ale organismului ca un produs secundar al metabolismului, deși unele tipuri de celule fabrică cantități mai mari pentru scopuri specifice. Compușii chimici „străini” aflați în organism, numiți xenobiotice, sunt metabolizați prin intermediul enzimelor xenobiotice cu sediul în microzomi.

2.2. Antioxidanții

Concomitent cu creșterea interesului în studiul radicalilor liberi, s-a dezvoltat și o serie de cercetări privitoare la modalitățile de contracarare a unor efecte nedorite ale acestora și în special a oxidării moleculare. Reacția de oxidare implică transferul de electroni sau protoni de la o substanță către un agent oxidant și ca urmare se formează radicali liberi. Procesul invers poartă numele de reducere și ca urmare este proces chimic în care un atom acceptă electroni.

Compușii moleculari care inhibă oxidarea moleculelor sunt numiți *antioxidanți* și contribuie decisiv la diminuarea sau combaterea unor efecte ale radicalilor liberi. În sistemele biologice, principalele enzime implicate în neutralizarea radicalilor liberi sunt superoxid dismutaza (SOD), metionin-reductaza și glutatation - reductaza. [2].

Efectele antioxidantilor se știu din vechime, dieta mediteraneană de fructe proaspete și legume, vinuri bune, pește și ulei de măsline – mono- nesaturate a fost asociată cu sănătatea umană și bunăstarea.

2.3. Metode specifice ale spectroscopiei RES în studiul radicalilor liberi și a antioxidantilor

Există două posibilități de a folosi spectroscopia RES în detecția radicalilor liberi, în funcție de mobilitatea acestora și de faza sistemului în care sunt generați și anume detecția directă și detecția indirectă.

2.3.1. Metoda marcherilor de spin („spin label”)

O categorie importantă a moleculelor cu caracteristici magnetice deosebite atât sub aspect științific, cât și practic, o reprezintă radicalii nitroxidici stabili sau markerii de spin (spin labels). Sintetizați pentru prima dată acum aproximativ 40 de ani, radicalii nitroxidici au în prezent un rol esențial ca probe de spin în studiul sistemelor biologice, precursori în obținerea unor materiale magnetice organice, indicatori de control în reacții de polimerizare și în oximetrie, agenți de contrast în tomografie și chiar ca substanțe terapeutice.

Radicalii nitroxidici sunt substanțe cu o reactivitate chimică relativ mare, participând într-o multitudine de reacții ca substrat.

Faptul că în cazul radicalilor nitroxidici, electronul neîmperecheat este localizat pe nucleul de azot ($I=1$), în câmp magnetic apare o structură spectrală formată din trei linii (Fig. 2.3.1.2.).

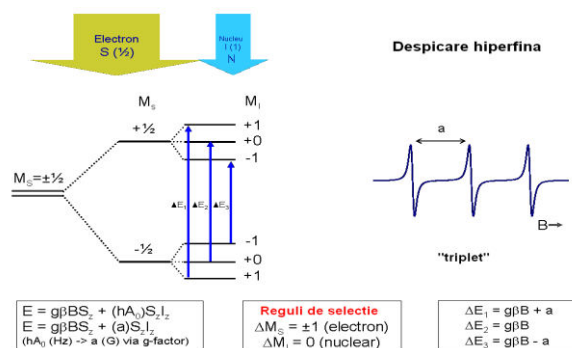


Fig. 2.3.1.2. Structura hiperfină radicalului nitroxidic

Analiza spectrelor RES a radicalilor nitroxidici este corelată cu trei aspecte importante în utilizarea acestora și anume:

- studiul sistemelor ordonate unde există variații ale parametrilor magnetici și în forma spectrelor, care este direct legată de caracteristici ale acestor sisteme,
- studiul dinamicii moleculare în sisteme amorfe sau cu diferite grade de neomogenitate (sisteme biologice - membrane celulare, sisteme proteice, etc.).
- analiza vitezei de reducere a radicalilor nitroxidici și transformarea în specii diamagnetice (studiul activității antioxidante).

2.3.2. Metoda capcanelor de spin („spin traps”)

Metoda capcanelor de spin este tehnică spectroscopică specifică în care un radical liber este captat, după ce reacționează cu un compus diamagnetic cu dublă legătură (capcana de spin). Se formează astfel un radical intermediar de tip nitroxidic (spin aduct) care poate fi detectat și caracterizat prin spectroscopie RES.



Figura 2.3.2.1 Formarea spin aducțiilor

Captarea spinului este un experiment de cinetică, cu intensitatea semnalului RES reflectată în concentrația stării stabile a spin aductului la momentul înregistrării spectrului. Din această cauză cantitatea de capcană de spin necesară obținerii unei concentrații optime a spin aductului va fi strâns legată de ratele de formare și recombinare a radicalilor liberi în reacțiile sistemului studiat.

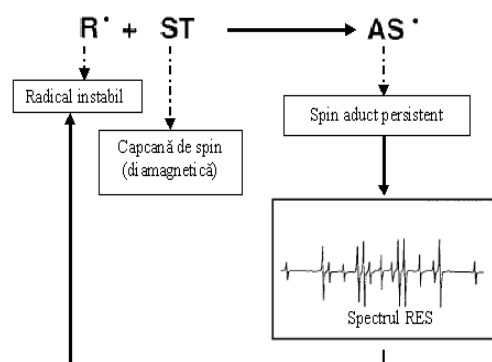


Figura 2.3.2.2. Tehnica formării spin aductului

Metoda capcanelor de spin poate fi folosită pentru determinarea eficienței diferitelor tipuri de antioxidanți față de diferite tipuri de radicali liberi, sau pentru detectarea acestor radicali liberi în anumite condiții experimentale.

De exemplu în Figura 2.3.2.3. este prezent procesul de formare a spin aductului și a spectrului RES pentru sistemul DMPO/OH•

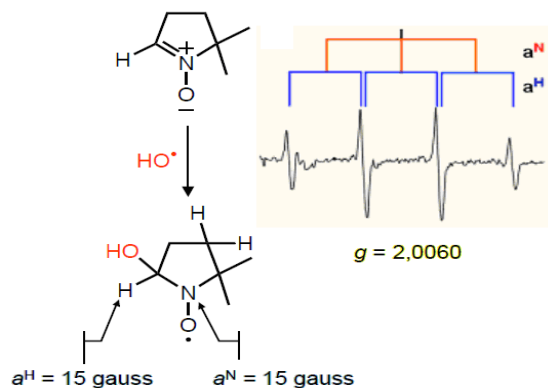


Figura 2.3.2.3. Formare a spin aductului și a spectrului RES pentru sistemul DMPO/OH•

Ca agenți captatori de radicali liberi (capcane de spin) sunt folosite nitronele și nitrosoderivații.

O schemă a reprezentării integralei duble a semnalului RES în funcție de timp, este prezentată în Figura 2.3.2.4.

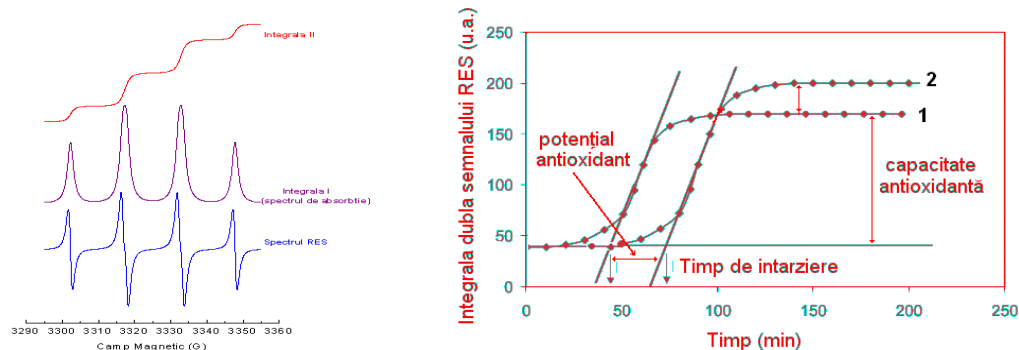


Figura 2.3.2.4 schemă a reprezentării integralei duble a semnalului RES

Tehnica RES de determinare a activității antioxidante constă în generarea de radicali OH● prin reacție Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) și înserarea acestei soluții în proba de studiat în care s-a introdus o capcană de spin. Prin înregistrarea spectrelor RES la anumite intervale de timp se evaluează *timpul de întârziere* care este durata după care activitatea antioxidantă a extractului este epuizată.

Astfel, caracteristicile antioxidante ale probelor pot fi efectiv monitorizate prin eliminarea radicalilor liberi inserați în proba de studiu. Aceasta implică caracterizarea cineticii activității antioxidante.

Bibliografie selectivă

1. R. Olinescu, *Radicali liberi în fiziopatologia umană*, Ed. Tehnică, București (1994)
2. Grigore Damian, *Biofizica radicalilor liberi și a antioxidanților*, note de curs, <http://www.phys.ubbcluj.ro/~grigore.damian/lectures.html>
3. L. Valgimigli, G.F. Pedulli & M. Paolini, *Measurement of oxidative stress by EPR radical-probe technique*, *Free Radical Biology & Medicine*, 31(6): 708–716, (2001)
4. M.G.L. Hertog, P.C.H. Hollman, M.B. Katan, D. Kromhout, *Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands*, *Nutrition and Cancer*, 20: 21-29, (1993)
5. G. Damian, *EPR investigation of γ -irradiated anti-emetic drugs*, *Talanta*, 60, (2003)
6. P. Bilsky, K. Reszka, M. Bilska, C. F. Chignell, *Oxidation of the Spin Trap 5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-Oxide by Singlet Oxygen in Aqueous Solution*, *Journal of the American Chemical Society*, 118: 1330-1338, (1996)
7. R.V. Lloyd, P.M. Hanna & R.P. Mason, *The Origin of the Hydroxyl Radical Oxygen in the Fenton Reaction*, *Free Radical Biology & Medicine*, 22: 885-888, (1997)
8. D. Griller & K.U. Ingold, *Free radical clocks*, *Accounts of Chemical Research*, 13: , (1980)
9. G.R. Buettner & W.L. Oberley, *Considerations in the Spin trapping of the superoxide and hydroxyl radical in aqueous systems using 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-1-oxide*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 83: 69-74, (1978)
10. E.G. Janzen & Y.K. Zhang, *Identification of Reactive Free Radicals with a New ^{31}P -Labeled DMPO Spin Trap*, *Journal of Organic Chemistry*, 60(17): 5441, (1995)
11. G. Damian & V. Miclăuș, *Radicali nitroxidici*, Editura Fundației pentru Studii Europene, Cluj-Napoca, (2001)
12. L. Nordio, *General Magnetic Resonance Theory in Spin Labeling. Theory and Applications*, Academic Press, ed. L.J. Berliner, (1976)
13. L. B Volodarsky, (Ed), *Imidazoline Nitroxides*, CRC Press, Boca Raton, (1988)
14. R.A. Floyd, K. Hensley, et al, *Nitrones, their value as therapeutics and probes to understand aging*, *Mechanisms of Ageing and Development*, 123: 1021-1031, (2002)
15. H.W. Pogrebniak, M. J. Merino, S. M. Hohn, J. B. Mitchell, H. I. Pass, *Spin trap salvage from endotoxemia: the role of cytokine down-regulation*, *Surgery*, 112, (1992)
16. K. Hensley, *Nitrone-based free radical traps as neuroprotective agents in cerebral ischemia and other pathologies*, *International Review of Neurobiology*, 40, (1997)

3. ANALIZA CALITĂȚII UNOR ALIMENTE VEGETALE PRIN SPECTROSCOPIE RES

3.1. Caracteristici calitative ale alimentelor și metode de analiză

În general prin calitatea alimentelor definim ca fiind o entitate de mare complexitate, care înglobează caracteristici senzoriale, fizico–chimice, biochimice, microbiologice și toxicologice.

Aceasta se datorează faptului că alimentul, prin calitatea sa, are implicații profunde asupra vieții reprezentând un factor esențial al proceselor metabolice și echilibrului organismului.

Metodele spectroscopice, (*Spectroscopia de absorbție atomică (AA)*, *Spectroscopia de emisie optică în plasmă cuplată inductiv (ICP-OES)*, *Spectrometria de emisie în plasmă cuplată cu spectrometria masă (ICP-MS)*, *Fluorescența de raze X*, *Spectroscopia în ultraviolet și vizibil (UV-VIS)*, *Spectroscopia IR (MIR și NIR)*, *Spectroscopia Raman*, *Spectroscopia RMN*, *Spectroscopia RES*, *Spectrometria de masă*, *Spectrometria de masă cuplată cu cromatografia de gaz (GC-MS) sau lichide (LC-MS)*, *Dicroism circular (DC)*) au devenit de un foarte mare interes în evaluarea calității produselor agricole, în special a produselor alimentare [1]. Aceste metode sunt foarte importante pentru analiza componentelor alimentare, deoarece acestea necesită cantități minime, nu impun condiții speciale de pregătire a probelor și oferă o analiză rapidă și permit mai multe teste pe o singură probă. Diferite metode de cercetare pot evidenția trăsături caracteristice și permit evaluarea calitativă și cantitativă a parametrilor specifici [2, 3].

3.2. Studiul prin Spectroscopie de Rezonanță Electronică de Spin (RES) a unor alimente

3.2.1 Elemente de bază și specifice aplicației spectroscopiei RES

Rezonanța Electronică de Spin (RES) având la bază absorbția radiației electromagnetice din domeniul microundelor de către sistemele moleculare paramagnetice situate într-un câmp magnetic static omogen, permite studiul sistemelor paramagnetice și ca urmare poate pune în evidență unele caracteristici ale centrilor paramagnetici situați în diferite matrice.

Studiul centrilor paramagnetici ai microelementelor

În cea mai mare majoritate a cercetărilor, studiul centrilor paramagnetici ai microelementelor prezenți în alimente este făcută prin liofilizarea probei și înregistrarea directă a spectrului RES, urmată de interpretările legate de tipul și caracteristicile probei.

În cazul produselor vegetale, prezența sau absența centrilor paramagnetici persistenti (ioni paramagnetici de fier, mangan sau radicali semichinonici) reflectă un anumit tip de cultivare a

produsului alimentar. Astfel o rezolvare a domeniului spectral atribuit manganului reflectă o mobilitate marită a ionului de mangan (foarte puțin legat în mediul proteic) în timp ce o rezolvare slabă arată o interacțiune și o stabilizare în centrele proteice [4].

Studiul activității antioxidante ale alimentelor sau a extraselor alimentare proaspete sau fermentate

Metoda utilizată în cercetările de evaluare a caracterului antioxidant al produselor de consum alimentare, este cea a radicalilor persistenți de tip radicali nitroxidici și DPPH-ul (2,2-diphenyl- 1- picrylhydrazyl) ca și agenți paramagnetici.

Radicalii nitroxidici sunt stabili față de oxidare, dar ei pot fi ușor reduși la hidroxilaminele corespunzătoare [5]. Potențialul redox standard al derivaților nitroxidici din piperidină ($E_0 = 0.2$ eV) este destul de mare pentru a oxida compușii biologici cum ar fi polifenolii, acidul ascorbic, semiquinonele și radicalii superoxizi.

Această metodă constă în monitorizarea reducerii radicalului nitroxidic de către compușii antioxidanți din probele studiate. Astfel, se constată că numărul speciilor paramagnetice inserate în probă dispare în timp cu diferite rate de scădere și acest fapt este corelat cu conținutul de compuși antioxidanți din probele studiate și implicit cu caracteristicile antioxidante.

Efecte ale sterilizării prin iradierea unor produse alimentare sau a unor condimente alimentare.

Iradierea alimentelor este tratamentul de expunere a alimentelor la radiații ionizante, pentru distrugerea bacteriilor dăunătoare și a altor organisme și a prelungi durata de viață a lor, având un efect benefic asupra calității și a siguranței. Iradierea diferitelor produse alimentare, inclusiv a condimentelor, cu diferite doze de radiații γ , a fost folosită pentru mulți ani în vederea dezinfecției și a decontaminării microbiene, cu scopul păstrării calității alimentelor pe o perioadă mai îndelungată.

De asemenea, metoda rezonanței electronice de spin (RES) reușește să pună în evidență o serie de proprietăți intime legate de structura electronică a defectului paramagnetic format în rețeaua solidului iradiat. Fiind o metodă sensibilă pentru detecția radicalilor liberi ea poate fi folosită și pentru studiul mecanismului de radioliză sau detectare a medicamentelor și alimentelor iradiate [6, 7].

3.2.2 Caracterizarea unor alimente vegetale cultivate în mediu organic și în seră prin spectroscopiei RES

3.2.2.1. Condiții de sol în cultivarea unor produse alimentare

Cercetări științifice privind calitatea produselor alimentare și extracte nutritive sunt ținte de importanță majoră, atât din punct de vedere comercial și al impactul acestora asupra sănătății umane [8,9].

Una dintre cele mai frecvente întrebări despre fructe și legume de pe piață, este de a deosebi cele cultivate în seră de cele cultivate în condiții naturale (organic) [10].

Cele mai multe fructe și legume cultivate în seră sunt cultivate în sol modificat cu compost și îngrășăminte organice. Dar aceste soluri modificate nu conțin întreaga gamă de elemente și substanțe esențiale [11].

3.2.2.2. Caracterizarea fructelor de căpșuni

În lucrarea de față s-a încercat să găsească elemente specifice de natură să discearnă între fructele pentru a două tipuri de căpșuni, și anume cultivate în seră și în condiții naturale (organic), folosind spectroscopia RES [4].

Spectrele RES de căpșuni liofilizate au fost înregistrate la temperatura camerei și sunt prezentate în Figura 3.2.2.1.

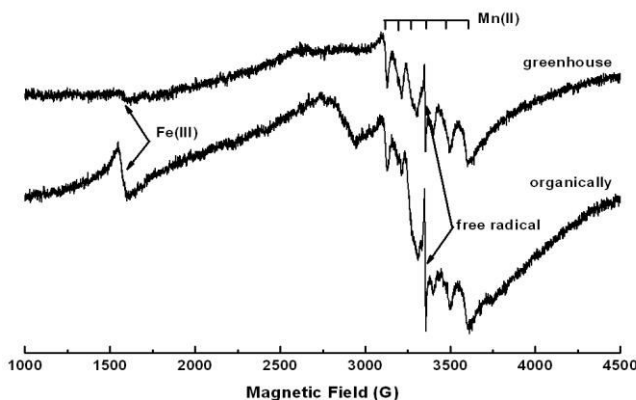


Figura 3.2.2.1 Spectrele RES ale fructelor de căpșuni liofilizate

Principalele caracteristici ale spectrelor RES sunt date de prezența semnalului caracteristic radicalului liber centrat pe $g = 2.004$ și a centrilor paramagnetici de Mn^{2+} și Fe^{3+} cu diferite intensități ale semnalului și cu anumite grade de rezolvare a liniilor de sextet pentru Mn^{2+} .

Astfel, în cazul de căpșunilor cultivați în seră, caracteristica semnalului Fe^{3+} este foarte slabă, arătând o prezență mică de fier în stare paramagnetică. Acest lucru poate fi din cauza

deficitului de fier din sol și din mediu (pH ridicat, conținut redus de materie organică, temperatură scăzută a solului) și a faptului că fierul este absorbit de către rădăcinile plantei foarte puțin sub forma de chelați de fier (majoritatea îngrășamintelor aplicate în special în culturile din seră conțin chelați de fier) [12, 13] .

Viteza de reacție dintre compușii antioxidanți (suc proaspăt) și ABTS⁺ a fost monitorizată cu ajutorul semnalului RES normalizată dublu rezidual integrat, care este corelată cu numărul de specii paramagnetice în timp (fig.3.2.2.2).

Spectrele RES ale probelor studiate arată diferențele interpretabile dintre probele analizate. Astfel se poate aprecia că în urma analizei activității antioxidante a extractelor de căpșuni studiate, capacitatea antioxidantă a căpșunilor cultivate natural (ecologic) este semnificativ mai mare decât cele cultivate în seră. Acest rezultat este reliefat prin constanta cinetică de reducere k ($k_{\text{organic}}=0.09$, $k_{\text{seră}}=0.058$).

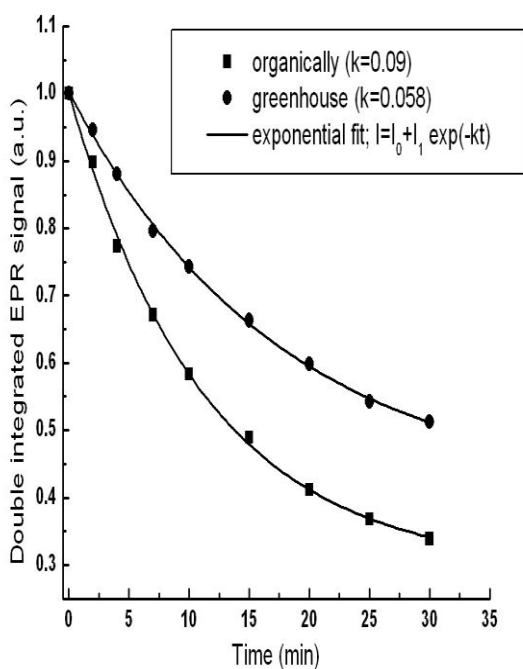


Figura 3.2.2.2. Reprezentarea variației integralei duble a semnalului RES în timp (activitatea antioxidantă a căpșunilor)

3.2.2.3. Caracterizarea tomatelor și a ardeilor

Spectrele RES a probelor de tomate sunt prezentate în Figura 3.2.2.3.1.

Caracteristicile principale ale spectrelor RES sunt date de prezența semnalului caracteristic radicalului liber centrat pe $g = 2.004$ și a centrilor paramagnetici de Mn^{2+} și Fe^{3+} cu

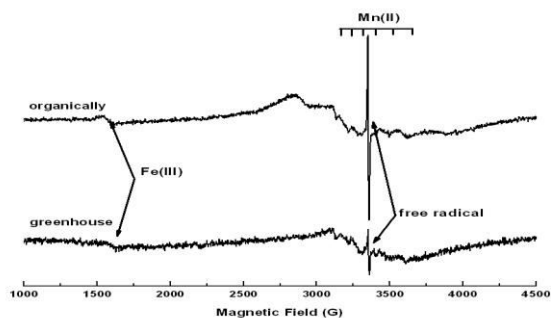


Figura 3.2.2.3.1 Spectrele RES ale probelor de tomate liofilizate

diferite intensități ale semnalului și cu anumite grade de rezolvare a liniilor de sextet pentru Mn^{2+} .

În cazul tomatelor crescute în mediu organic se observă și o suprapunere a unui semnal slab rezolvat care poate fi atribuit unor urme de ioni de cupru.

Ca și în cazul fructelor de căpșuni, pentru tomatele cultivate în seră, semnalul caracteristic Fe^{3+} este foarte slab, arătând o prezență mică de fier în stare paramagnetică și care poate fi corelat cu deficitul de fier asimilat de plantă din mediul de cultură.

În spectrele probelor de ardei gras, se observă caracteristici spectrale cu unele diferențe interpretabile. Spectrele sunt prezentate în Figura 3.2.2.3.2.

Rata reacției dintre compușii antioxidanți din suc și $ABTS^+$ a fost monitorizată prin

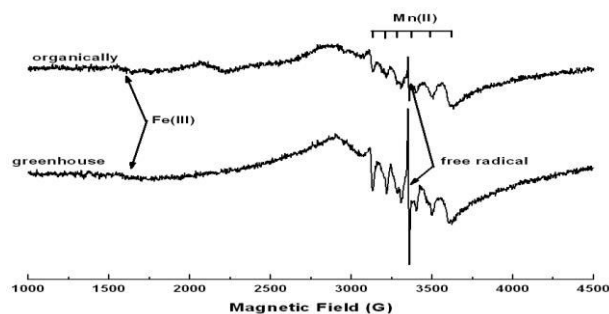


Figura 3.2.2.3.2. Spectrele RES ale probelor de ardei gras liofilizate

urmărirea semnalului RES. Pentru evaluarea activității antioxidante a fost utilizată integrală dublă a semnalului RES, care este corelată cu variația numărului speciilor paramagnetice ($ABTS^+$) în timp. Rezultatul acestor măsurători este reprezentat în figurile 3.2.2.3.3. și 3.2.2.3.4.

Reprezentarea grafică a cineticii de reducere a fost dată de viteza de reacție dintre compuşii antioxidanți (suc proaspăt) și $ABTS^+$ și a fost monitorizată cu ajutorul semnalului RES

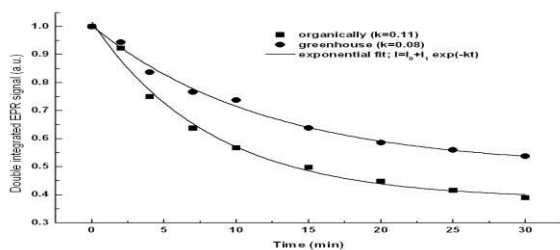


Figura 3.2.2.3.3. Reprezentarea variației integralei duble a semnalului RES în timp (activitatea antioxidantă a tomatelor)

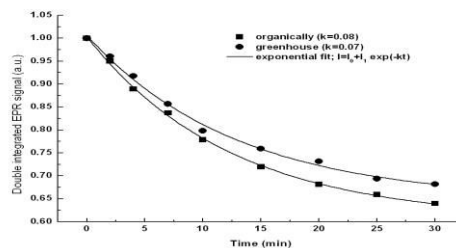


Figura 3.2.2.3.4. Reprezentarea variației integralei duble a semnalului RES în timp (activitatea antioxidantă a ardeilor)

normalizată dublu rezidual integrat, care este

corelată cu numărul de specii paramagnetice în timp [14]. Ca și în celelalte situații cel mai bun rezultat a fost obținut prin fitare utilizând funcția exponențială de ordinul întâi.

Studiul activității antioxidante a sucurilor proaspete arată că capacitatea antioxidantă a produselor alimentare cultivate în mod natural (ecologic) este semnificativ mai mare decât cele cultivate în seră.

Bibliografie selectivă

1. A. Nawrocka and J. Lamorska, *Determination of Food Quality by Using Spectroscopic Methods, in Advances in Agrophysical Research*, Ed. Stanislaw Grundas and Andrzej Stepniewski, ISBN 978-953-51-1184-9, InTech, (2013)
2. M. Hohmann, N. Christoph, H. Wachter, U. Holzgrabe, *J. Agric. Food Chem.*, , 62(33), (2014)
3. A. Tres, G. van der Veer, M.D. Perez-Marin, S.M. van Ruth, A. Garrido-Varo, *J Agric Food Chem*, 60(33), 8129] (2012)
4. **Ioan Csillag**, Grigore Damian, *EPR study of the strawberries grown in the greenhouse and organically*, Studia UBB, Seria Chemia (trimisă spre publicare)
5. G. Damian & V. Miclăuș, *Radicali nitroxidici*, Editura Fundației pentru Studii Europene EFES, Cluj-Napoca, (2001)
6. G. Damian, V. Miclăuș, Laura Bolojan, **I. Csillag**, *Detection and characterization of free radicals in some gamma irradiated drugs and foods by EPR spectroscopy, Proceedings of the 10th International Symposium on Metal Elements In Environment, Medicine and Biology* , November 11-12, Publishing House "Eurobit" Timișoara, pp.115-120, ISSN 1583 – 4204, (2010)
7. G. Damian, *EPR investigation of γ -irradiated anti-emetic drugs*, *Talanta*, 60,923-927, (2003)
8. S.A. El Sohaimy, *Functional Foods and Nutraceuticals-Modern Approach to Food Science*, *World Applied Sciences Journal* 20 (5): 691-708, (2012)
9. Kanti Bhooshan Pandey and Syed Ibrahim Rizvi, *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease*, *Oxid Med Cell Longev*. 2(5): 270–278, (2009)
10. American Chemical Society. "How to prevent organic food fraud." *ScienceDaily*, www.sciencedaily.com/releases/2014/08/140827111944.htm, (2014)
11. Torun, A.A., S. Serçe, Y.A. Kaçar, N. Erdem, H. Erdem. B. Bicen, I Tolay, *Screening of wild strawberry genotypes against iron deficiency under greenhouse conditions*. *Notulae Not. Bot. Horti. Agrobi.* 41: 560-566, (2013)
12. .M. Stewart, Dibb, D.W.; Johnston, A.E.; Smyth, T.J. "The Contribution of Commercial Fertilizer Nutrients to Food Production". *Agronomy Journal* 97: 1–6. doi:10.2134/agronj2005.0001 (2005)
13. Ying Yi and Mary Lou Guerinot, *Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency*. *The Plant Journal* Volume 10, Issue 5, pages 835–844, (1996)
14. Grigore Damian, *Biofizica radicalilor liberi și a antioxidanților, note de curs*, <http://www.phys.ubbcluj.ro/~grigore.damian/lectures.html>

4. STUDIUL RES AL UNOR COMPUȘI DE INTERES FARMACEUTIC

4.1. Aspecte generale privind aplicarea spectroscopiei RES în studiul compușilor de interes farmaceutic

Sub titulatura de compuși biofarmaceutici, sunt incluse acele substanțe naturale, extracte vegetale sau substanțe sintetizate, care prezintă activitate biologică asupra organismelor, doar dacă organismul dispune de aceste substanțe, în doze optime. O parte din acești compuși se fabrică chiar în organism, în timp ce, de cealaltă parte, organismul poate beneficia doar din afară, ajungând în corp din hrană, din lichidele ingerate sau prin administrare.

4.2. Studiul activității antioxidante ale unor extracte din plante farmaceutice

Concomitent cu cercetările asupra radicalilor liberi s-au intensificat și studiile asupra antioxidanților naturali datorită capacității acestora din urmă de a proteja organismele și celulele de la daune cauzate de stresul oxidativ. În ultimii ani atenția cercetătorilor a fost axată pe produsele antioxidante obținute din diferitele plante, condimente [2-4] și alte materiale biologice care prezintă un interes considerabil datorită siguranței lor și a potențialelor efecte atât nutritive cât și terapeutice. În general, antioxidanți prezenți în plantele superioare (vasculare), sunt considerați constituenți cu potențială valoare terapeutică.

În lucrarea de față au fost studiate trei extracte de plante medicinale cunoscute ca având potențial terapeutic și anume *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* și *Teucrium chamaedrys*. Studiul asupra acestor extracte a fost unul complex și a fost făcut împreună cu un colectiv de la Facultatea de Farmacie, a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca, vizând atât caracterul antioxidant cât și cel antimicrobian al acestora [5].

Isopul (*Hyssopus officinalis*) este o plantă erbacee din familia Lamiaceae, folosită atât ca mirodenie în preparatele culinare cât și în scopuri medicinale. Planta este originară din sudul Europei, Orientul Mijlociu și până în apropierea Mării Caspice. Beneficiile isopului le erau cunoscute vechilor civilizații; însuși numele actual al plantei este adaptat după un termen grecesc (*hyssōpos* = „plantă sfântă”) care descrie utilizarea sa – frunzele de isop erau întrebuințate pentru curățarea templelor. Ca plantă medicinală isopul este utilizat frecvent în tratarea bronșitelor, astmului și are proprietăți expectorante, antiseptice și cicatrizante.



Busuiocul (*Ocimum basilicum*) este o plantă originară din Asia tropicală din genul *Ocimum*, familia Lamiaceae. Termenul de busuioc provine din limba greacă, βασιλευς (*basileus*) însemnând „rege”, despre această plantă spunându-se că a crescut pe locul unde Împărații Constantin și Elena au descoperit Sfânta Cruce. De aceea, busuiocul este perceput și ca o plantă sfântă, astfel că preotii ortodocși și catolici folosesc busuiocul pentru a-l înmuia în apa sfințită și a stropi lucrurile și ființele pentru a le da binecuvantarea.



Dumbetul (*Teucrium chamaedrys*) este o planta perenă care crește în regiunile cu pajiști sau păduri din Europa, pe coasta Mării Mediterane, atât în nord cât și în est. Această plantă are aspectul unui semiarbust de până la 40 cm, frunzele sunt verzi cu marginile puternic dințate, iar florile hermafrodite, tubulare, de culoare roz-violet. Dumbetul este cunoscut și cu numele de jugărel, dumbăț sau sclipet, face parte din familia Lamiaceae.



4.2.1. Prepararea probelor și determinarea conținutului de polifenoli

Părțile aeriene din perioada de înflorire a plantelor de Isop și Busuioc au fost recoltate din câmpurile experimentale ale Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca, iar plantele de Dumbet *Teucrium chamaedrys* din flora spontană de pe Valea Arieșului au fost recoltate în luna iulie 2013.

O cantitate de 20 grame din fiecare probă a fost folosită pentru obținerea unui extras folosind 200 ml de etanol 70%, timp de 30 min pe o baie de apă aflată la 60°C. Probele au fost apoi răcite și centrifugate la 4500 rpm timp de 20 min. Pentru analiza conținutului de polifenoli prin alte metode spectroscopice (Folin-Ciocâteu, UV-vis și analiză HPLC) au fost preparate soluțiile stoc ca standarde de referință din 10 mg de clorogenic, p-cumaric, cafeic, cichoric, caftaric, ferulic, sinapic, gentisic acizi galic, rutin, quercetin, isoquercitrin, quercitrin, hyperoside, kaempferol, myricetol, fisetin, patuletin, apigenina, luteolina dizolvate în metanol și separate în baloane de 10 ml după o procedură descrisă pe larg în [5-7].

Conținutul total de *fenoli* (Total Phenolic Contents -TPC) din extracte au fost măsurate folosind metoda Folin-Ciocalteu. Metoda Folin-Ciocalteu are la bază oxidarea extractului de studiat cu ajutorul unui molibdowolfram (Na₂WO₄ / Na₂MoO₄).

Conținutul total de *flavonoide* a fost determinat și exprimat folosind ca etalon rutinul (compus fenolic) și folosind metodologia descrisă în Romanian Pharmacopoeia [8].

Conținutul de *derivați ai acidului cafeic* conținuți în probele studiate, a fost determinat prin metoda spectrofotometrică folosind un reagent Arnou (10 g nitrit de sodiu, 10 g molibdat de sodiu în 100 mL apă distilată).

Rezultatele privind conținutul total de polifenoli, flavonoide și derivați ai acidului cafeic cresc în ordinea

H. officinalis < *O. Basilicum* < *T. chamaedrys*

4.2.2. Analiza caracteristicilor antioxidante

Caracteristicile antioxidante ale extractelor etanolice de *H. officinalis*, *O. basilicum* și *T. Chamaedrys* au fost studiate prin patru tehnici și anume spectrofotometric folosind DPPH, TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), testul HAPX (hemoglobin ascorbate peroxidase activity inhibition assay) și RES (Rezonanța Electronică de Spin).

Înregistrarea spectrelor a fost făcută la temperatura camerei. O reprezentare ilustrativă a scăderii amplitudinii semnalelor radicalului Tempo la diferite intervale de timp sunt prezentate în figura 4.2.2.1.

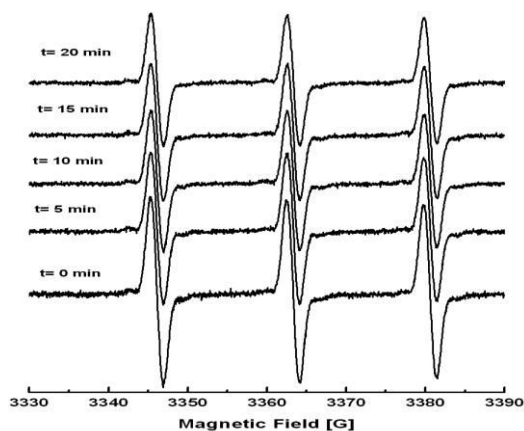


Figura 4.2.2.1. Spectrele RES ale radicalului TEMPO la diferite intervale de timp în proba de extract *H. officinalis*

Comparând ratele cinetice a probelor studiate se poate observa că *H. officinalis* (HO) are cea mai semnificativă activitate antioxidantă ($k_{HO} = 0.156$) comparabil cu activitatea antioxidantului de acid galic ($k_{AG} = 0.16$), considerat ca și etalon și față de care se pot face aprecieri. Extractele de *O. basilicum* (OB) și *T. chamaedrys* (TC) au o activitate antioxidantă mai moderată, constantele cinetice având valorile $k_{OB}=0.068$, respectiv $k_{TC}=0.049$.

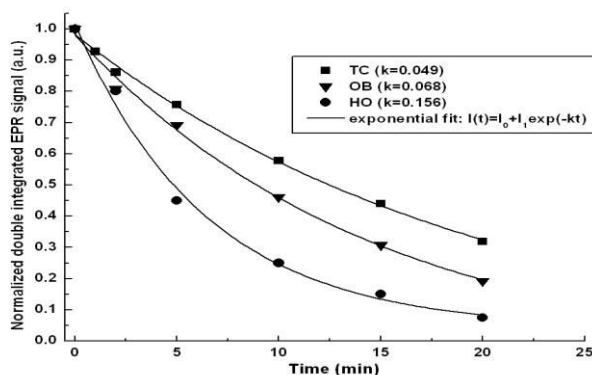


Fig. 4.2.2.2. Reprezentarea vitezei de scădere a intensității semnalelor RES sub acțiunea extractelor de *Teucrium chamaedrys*(TC), *Ocimum basilicum*(OB) și *Hyssopus officinalis*(HO)

4.3. Studiul efectelor radiațiilor gamma asupra unor medicamente

Purinetholul [1,7-dihydro-6H-purine-6-thione,

$C_5H_4N_4S \times H_2O$] sau 6-mercaptapurina, este un agent antineoplazic care inhibă metabolismul purinic (inhibă producerea acidului uric). Se administrează în chimioterapie, pentru tratarea leucemiilor acute, atât în inducerea remisiunilor și

în mod particular, în terapia de întreținere din leucemia limfoblastică acută și mielocitară acută.

Spectrele RES ale pulberilor de purinethol iradiate cu radiații gama (fig.4.3.2.), demonstrează prezența mai multor specii paramagnetice stabile, concentrația relativă a acestora depinzând de doza absorbită [9].

Pentru determinarea parametrilor magnetici specifici, spectrul a fost simulat cu programul POWFIT, plecând de la o configurație minimă de specii paramagnetice (fig. 4.3.3.).

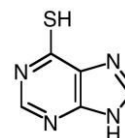


Fig.4.3.1. Structura chimică a Purinetholului

Spectrul pare să aparțină în principal radicalului sulfonil RSO⁻ format prin oxidarea radicalului thyl. Anizotropia spectrului este datorată probabil localizării centrilor radicalici pe ambele inele aromatice, determinând un aranjament local axial. În plus, ca urmare a simulării, se constată că în afara radicalului thyl, mai există două specii paramagnetice. Ambele specii radicalice par a fi radicali centrați pe oxigen, care interacționează cu un proton β și un proton γ.

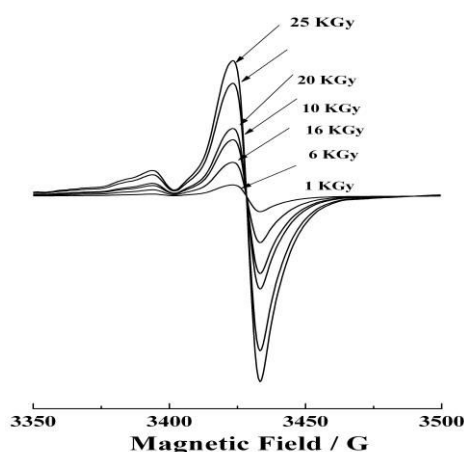


Figura 4.3.2. Spectrele RES ale Purinetolui iradiat gamma la diferite doze

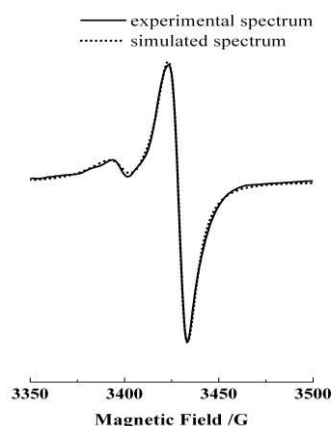


Figura 4.3.3. Spectrul RES ale Purinetolui iradiat gamma la 20kGy, experimental și simulat

Concentrația radicalilor crește după o funcție polinomială de ordinul 4, astfel că după o creștere semnificativă la doze absorbite de până la 15 kGy, apare o variație mai lentă la valori ridicate ale dozei de iradiere, până la atingerea unei faze de platou (Fig.4.3.3.) care corespunde saturării tuturor speciilor radicalice. Se pare că pe durata iradierii radicalii se recombina prin procese rapide, altele decât cele care au loc în absența radiației (după radioliză). Integrala relativă a intensităților spectrelor de absorbție RES a fost obținută prin fitarea parametrilor, dată de următoarea relație relativă:

$$I(D) = I_0 + I_1 D + I_2 D^2 + I_3 D^3 + I_4 D^4$$

unde I reprezintă valoarea corespunzătoare concentrației de radicali liberi la o anumită doză, k este rata cinetică de reacție, iar D doza absorbită.

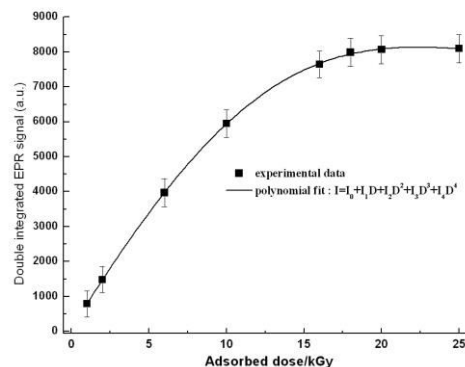


Fig. 4.3.4. Curba doză răspuns

Medicamente beta-blocante

Atenololul (alte denumiri: Ablok, Atenalon, Atenol, Atenopress, Ateneo, Plenacor) este o substanță hidrofilă. Aceste se absoarbe mai puțin digestiv (50%) și este puțin biotransformat la primul pasaj hepatic (~ 0%). Atenololul are absorbția scăzută prin alimente și antiacide cu aluminiu. Eliminarea acestuia se face prin rinichi, având timpul de înjumătățire $T_{1/2} = 9$ ore. Acesta blochează cu o oarecare selectivitate receptorii β_1 (în comparație cu receptorii β_2). Dozele terapeutice, îndeosebi cele mici, acționează selectiv asupra inimii, ceea ce reprezintă un avantaj atunci când aritmia coincide cu astmul bronșic [10].

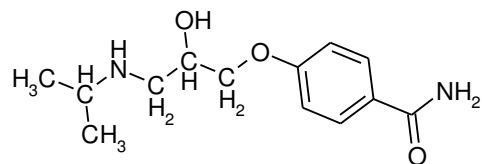


Fig.
4.3.4. Structura chimică a Atenololului

Pindololul (alte denumiri: Durapindol, Pectobloc, Pindololum, Visken) este un beta-adrenolitic neselectiv (în funcție de afinitatea pentru receptorii andrenergici), cu efect simpatomimetic evident. Are o absorbție orală și biodisponibilitate de peste 90%. Este nemetabolizat la primul pasaj hepatic. Se elimină prin ficat (60%) și prin rinichi (40%), $T_{1/2} = 3 - 4$ ore. Acțiunea sa este prelungită la vârstnici și în insuficiența hepatică [10].

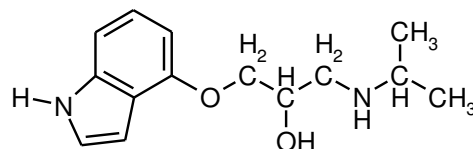


Fig.4.3.5. Structura chimică a Pindololului

Prin iradiere γ au fost generați radicali liberi care au fost caracterizați prin spectroscopie RES [1]. Pentru analiza acestora s-au făcut simulări ale spectrelor experimentale plecând de la o configurație minimă a numărului de specii radicalice. În Figura 4.3.6. sunt prezentate spectrele experimentale și simulate a probelor studiate de medicamente beta-blocante.

Spectrul RES obținut pentru proba de *Pindolol* reprezintă o sumă de spectre corespunzătoare tuturor radicalilor liberi prezenți simultan în probă, fiind dominat de o linie centrală largă. Semnalul larg observat este caracteristic pentru radicalii liberi prinși într-o matrice solidă [11].

Spectrul RES obținut pentru proba de *Atenolol* a fost atribuit suprapunerii spectrelor a doi radicali. Primul radical constă dintr-un triplet centrat la $g = 2.003 \pm 0.0005$, având o lărgime a liniei $\Delta B = 9.8$ G, din cauza a doi protoni echivalenți cu constanta de despicare hiperfină a_1 (H) = a_2 (H) = 16.3 G. Acest radical s-a presupus a fi în bună concordanță cu cuplajul izotrop, în general găsit pentru radicalii π centrați pe carbon, având forma $R - \overset{\cdot}{C}H_2$ și fiind produs prin

deplasarea hidrogenului de la grupul (metil-). Pentru cel de-al doilea radical, electronul neîmperecheat poate fi localizat pe atomul de azot al grupului Imidazolic, conducând la o despicare hiperfină caracteristică $a_N = 16 \text{ G} - 18 \text{ G}$ și $g = 2.009 \pm 0.0005$

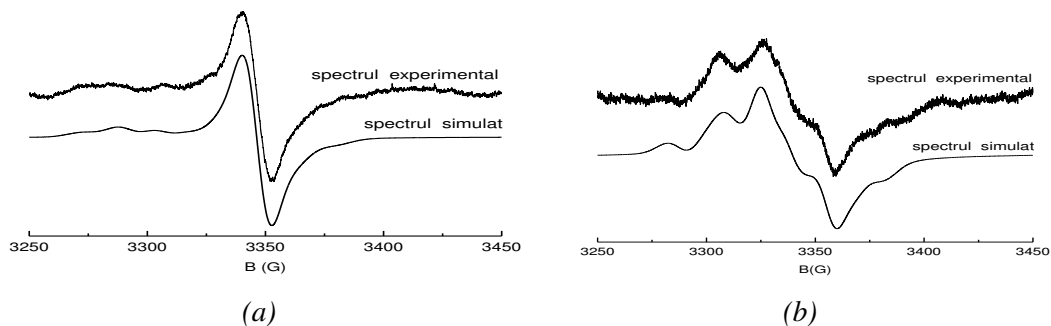


Figura 4.3.6. Spectrele RES ale probelor iradiate gamma a) Pindolol, (b) Atenolol

Prin urmare, chiar dacă medicamentele studiate fac parte din aceeași familie terapeutică și cu structuri chimice destul de similare, în urma iradierii nu prezintă aceleași tipuri de radicali liberi. Acest lucru a fost constatat și de către alți cercetători privind alte tipuri de medicamente din clasa beta-blocantelor.

Bibliografie selectivă

1. G. Damian, V. Miclăuș, L. Bolojan, **I. Csillag**, *Detection and characterization of free radicals in some gamma irradiated drugs and foods by EPR spectroscopy*, Proceedings of the 10th International Symposium on Metal Elements In Environment, Medicine and Biology, November 11-12, 2010, Publishing House “Eurobit” Timișoara, pp.115-120, ISSN 1583 – 4204
2. De Judicibus, M. *Botanical Notebook*; Warburton, Vic. Eds.; Custom Book Centre, University of Melbourne: Melbourne, Australia, 2011; p. 116.
3. V. Lobo; A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health*, *Pharmacogn. Rev.* 2010, 4, 118–126.
4. H. Amiri, *Antioxidant activity of the essential oil and methanolic extract of Teucrium orientale*(L.) subsp. *taylori* (Boiss.) Rech. f. *Iran J. Pharm. Res.* **2010**, 9, 417–423
5. L. Vlase, D. Benedec, D. Hanganu, G. Damian, **I. Csillag**, B. Sevastre, A. C. Mot, R. Silaghi-Dumitrescu and I. Tilea, *Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities and Phenolic Profile for Hyssopus officinalis, Ocimum basilicum and Teucrium chamaedrys*, *Molecules*, 19(5), 5490-5507; doi:10.3390/molecules 19055490 (2014)
6. D. Benedec, L. Vlase, D. Hanganu, I. Oniga, *Antioxidant potential and polyphenolic content of Romanian Ocimum basilicum*. *Dig. J. Nanomater. Bios.* 2012, 7, 1263–1270.
7. R.N.T. Meda, L. Vlase, A. Lamien-Meda, C.E. Lamien, D. Muntean, B. Tipericiuc, I. Oniga, O.G. Nacoulma, *Identification and quantification of phenolic compounds from Balanites aegyptiaca (L) Del (Balanitaceae) galls and leaves by HPLC-MS*. *Nat. Prod. Res.* 2011, 25, 93–99
8. Romanian Pharmacopoeia Commission National Medicines Agency. *Romanian Pharmacopoeia*, Xth ed.; Medical Publishing House: Bucharest, Romania, 1993.
9. Laura Bolojan, **Ioan Csillag**, Vasile Miclaus, Grigore Damian, *Free radicals investigation in γ -irradiated Purinethol (6-MP)*, *Farmacia*, acceptată spre publicare
10. Stroescu, *Bazele farmacologice ale practicii medicale*, vol.I, Editura Medicală, București, 265, 331-332, (1989)
11. J. Raffi, S. Gelly, L. Barral, F. Burger, P. Piccerelle, P. Prinderre, M. Baron, A. Chamayou, *Electron Paramagnetic Resonance of radicals induced in drugs and excipients by radiation or mechanical treatments*, *Spectrochimica Acta Part A* 58: 1313 – 1320, (2002)

CONCLUZII

➤ Folosind Spectroscopia de Rezonanță Electronică de Spin (RES) s-a putut studia natura și caracteristicile centrilor paramagnetici ai microelementelor prezenți în unele alimente de natură vegetală, prin liofilizarea probei și înregistrarea directă a spectrului RES, urmată de interpretările legate de tipul și caracteristicile probei. În urma studiului fructelor de căpșuni, tomate și ardei gras s-a arătat că:

- prezența sau absența centrilor paramagnetici persistenți (ioni paramagnetici de fier, mangan sau radicali semichinonici) reflectă un anumit tip de cultivare a produsului alimentar.

- forma și gradul de rezolvare a structurii spectrale RES da informații asupra modalității metabolice de asimilare care poate fi corelat cu modalitățile specifice de cultivare (în mediu deschis, seră, mod de administrare a nutrienților, etc.). Astfel o rezolvare a domeniului spectral atribuit manganului reflectă o mobilitate marită a ionului de mangan (foarte puțin legat în mediul proteic) în timp ce o rezolvare slabă arată o interacțiune și o stabilizare în centrele proteice.

- detectarea și caracterizarea acestor specii paramagnetice poate fi un indicator important (o amprentă spectroscopică) în detectarea fructelor cultivate în seră și crescute în condiții naturale.

➤ Metoda propusă pentru analiza calitativă a activității antioxidante, este bazată pe monitorizarea reducerii radicalilor persistenți Tempo (*2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy*), radicalul cationic ABTS⁺ (*2,2'-azinobis (acid 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic)*) și DPPH (*2,2-diphenyl- 1- picrylhydrazyl*). Descreșterea concentrației relative a speciilor paramagnetice (reducerea radicalului stabil) este obținută prin dubla integrare a spectrelor experimentale. Numărul speciilor paramagnetice prezintă o scădere în timp cu diferite rate, acest lucru fiind corelat cu activitatea antioxidantă a probelor studiate. Pentru probele studiate, sucuri naturale sau extracte ale etanolice din unele plante de interes farmaceutic cinetica de reducere a radicalului stabil este dat de o cinetică de ordinul întâi în care parametrul specific fiecărui tip de extract și a tipului de procesare, este parametrul cinetic de reacție k reprezentând viteza de oxido-reducere a radicalilor în timp. Acest parametru este o măsură a caracteristicilor antioxidante a probei studiate. Totuși pentru o caracterizare mai completă a activității antioxidante și a înțelegerii mai exacte a factorilor chimici și fizici cu rol semnificativ în activitatea antioxidantă a probelor studiate este necesară utilizarea unor tehnici suplimentare (metoda Folin-Ciocalteu, HPLC etc.). În urma cercetărilor efectuate în această teză s-au conturat următoarele rezultate:

- din studiul activității antioxidante a sucurilor proaspete s-a arătat că, capacitatea antioxidantă a produselor alimentare cultivate în mod natural (ecologic) este semnificativ mai mare decât cele cultivate în seră.

- pentru extrasele etanolice din plante, s-a observat că *H. officinalis* (Isop) are cea mai semnificativă activitate antioxidantă ($k_{HO} = 0.156$) comparabil cu activitatea antioxidantului de acid galic ($k_{AG} = 0.16$ considerat etalon) în timp ce extractele de *O. basilicum* (Busuioc) și *T. chamaedrys* (Drumbet) au o activitate antioxidantă mai moderată, constantele cinetice având valorile $k_{OB}=0.068$, respectiv $k_{TC}=0.049$.

➤ O aplicație importantă a spectroscopiei RES abordată în această teză este cea de studiu a efectelor radiației gamma asupra unor medicamente și anume Purinetol, Atenolol și Pindolol, cu scopul caracterizării efectelor induse de radiație în structura acestora. Astfel de cercetări furnizează informații utile în procesele tehnologice de fabricare, sterilizare și conservare a medicamentelor precum și în metodologia de administrare medicală sau a termenelor de valabilitate. Se pot obține astfel date importante privitoare la influenței tehnologiei de preparare asupra generării radicalilor liberi, a formelor farmaceutice asupra stabilității în timp și a factorilor care influențează această stabilitate. Rezultatele obținute pot fi sintetizate astfel:

- reacția cea mai importantă care contribuie la degradarea purinetholului, implică oxidarea atomului de sulf din poziția 6 a inelului purinic. În afara radicalului thyl, mai există două specii paramagnetice cu parametri magnetici care par a fi specifici radicalilor centrați pe oxigen, care interacționează cu un proton β și un proton γ .

- pentru medicamentele beta-blocante (Pindolol și Atenolol) deși fac parte din aceeași familie terapeutică și au structuri chimice destul de similare, în urma iradierii nu prezintă aceleași tipuri de radicali liberi. Pentru compusul Pindolol, valoarea factorului g izotrop, obținută - $g_0 = 2.005 \pm 0.0005$, este caracteristică pentru radicalii centrați pe (carbon-) sau (azot-). Spectrul RES al Atenololului iradiat a fost atribuit suprapunerii spectrelor a doi radicali. Un prim radical format dintr-un triplet, s-a presupus a fi în bună concordanță cu cuplajul izotrop, tipic pentru radicalii π centrați pe carbon, având forma $R-\overset{\cdot}{C}H_2$ și fiind produs prin deplasare a hidrogenului de la grupul (metil-). Cel de-al doilea radical, are electronul neîmperecheat localizat pe atomul de azot al grupului imidazolic, conducând la o desplicare hiperfină caracteristică azotului ($a_N = 16 \text{ G} - 18 \text{ G}$).

Cuvinte cheie:

Spectroscopie RES, radicali liberi, antioxidanți, căpșuni, ardei, isop, busioc, dumbetul purinetol, atenolol și pindolol