

UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA
Facultatea de Fizică

Laura Bolojan

**Caracterizarea radicalilor liberi din sisteme
biomedicale și biofarmaceutice**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător științific
Prof. univ. dr. Grigore DAMIAN

Cluj-Napoca
2012

Mulțumiri

Elaborarea și fundamentarea științifică a unei teze de doctorat este posibilă doar prin prisma unei îndrumări științifice de calitate realizate cu profesionalism și exigență. Deosebită recunoștință și mulțumiri datorez domnului Prof. Univ. Dr. Grigore Damian atât în calitatea 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. Îi mulțumesc de asemenea pentru înțelegerea și căldura cu care m-a călăuzit. Adresez mulțumiri speciale domnului Prof. Dr. Heinz Jürgen Steinhoff, de la Universitatea din Osnabrueck, Germania, coordonatorul științific pe perioada stagiului de mobilitate, 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 câmp înalt. Mulțumesc tuturor celor care pe perioada stagiului au contribuit la dezvoltarea mea profesională, m-au susținut și încurajat în permanență: Johann, Daniel, John și Christian. Mulțumesc Cristinei pentru că mi-a împărtășit mare parte din experiența ei, dar care în același timp mi-a oferit alinare în momentele de singurătate.

Doresc să adresez mulțumirile cuvenite tuturor celor care, direct sau indirect, prin sugestiile oferite au contribuit la șlefuirea acestui demers științific și m-au susținut în finalizarea lui. Mulțumesc domnului Prof. Univ. Dr. Leontin David cel care m-a făcut să privesc fizica cu interes, curiozitate dar și cu afecțiune, care m-a susținut moral de-a lungul timpului. Mulțumesc de asemenea domnului conferențiar Vasile Miclăuș pentru sfaturile edificative oferite în momentele de rătăcire pe întortocheatul tărâm al chimiei. Mulțumesc doamnelor doctor Adriana Filip și Nicoleta Vedeanu, colaboratoare de înaltă valoare profesională. Le mulțumesc Cameliei care a fost alături de mine în lungile zile de vară în care redactam teza și îi mulțumesc Luciane pentru altruismul și empatia cu care m-a sprijinit pe tot parcursul stagiului doctoral.

În mod special, doresc să mulțumesc pentru suportul financiar asigurat de Programul cofinanțat prin Programul Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, Contract POSDRU 6/1.5/S/3- "Studii doctorale: prin știință spre societate".

Nu în ultimul rând, mulțumesc din suflet familiei care m-a sprijinit pe toată perioada derulării stagiului de doctorat...și nu numai..., părinților mei iubiți fiindu-le dedicată această reușită. Ei mi-au insuflat dorința de a evolua în permanență, de a încerca lucruri noi, susținându-mă cu dragoste nemărginită și necondiționată în tot ceea ce am realizat. Le mulțumesc persoanelor care dau un sens vieții mele, neprețuitei mele fiice Maria ("Soarele, Luna și Steaua mea") și iubitelui meu soț Doru, care au avut răbdarea de a-mi suporta absența, pentru încrederea în mine, dragostea lor și permanenta încurajare.

Cuprins

Introducere	1
I. Caracterizarea și generarea radicalilor liberi	4
I.1 Caracterizarea radicalilor	4
I.2 Generarea radicalilor liberi	4
I.2.1 Homoliza	5
I.2.2 Fotoliza și radioliza.....	5
I.2.3 Reacțiile enzimaticе	5
I.2.4 Metabolizarea.....	6
I.2.5 Radicali liberi existenți în natură	6
I.2.6 Generarea SRO în organisme vii.....	6
II. Metode de detecție a radicalilor liberi	7
II.1 Spectrofotometria	7
II.2 Chemiluminiscența	7
II.3 Rezonanța electronică de spin (RES).....	7
II.3.1 Tehnici de măsurare RES.....	8
II.3.2 Metode de detecție RES a radicalilor liberi.....	8
II.3.2.1 Aplicații ale capcanelor de spin în analiza RES a unor sisteme	8
II.3.2.2 Aplicații ale radicalilor nitroxidici în studiul RES al unor sisteme	10
III. Detecția directă prin spectroscopie RES a radicalilor liberi generați în unele sisteme biofarmaceutice	11
III.1 Rășini dentare	11
III.2 Purinethol	13
III.3 Clorhidrat de metformin.....	14
IV. Detecția indirectă prin metoda „spin trapping” (ST/EPR) a radicalilor liberi generați în unele sisteme biomedicale	16
IV.1 Reacția Fenton.....	16
IV.2 Superoxidul de potasiu	18
IV.3 Xantin-xantin oxidaza	20
V. Caracterizarea compușilor antioxidanți	21
V.1 Tipuri de antioxidanți.....	21
V.2 Stresul oxidativ.....	21
V.3 Determinarea activității antioxidante.....	21
V.4 Rezultate asupra sistemelor studiate	22
V.4.1 Sucuri naturale și comerciale	22
V.4.2 Extracte naturale.....	23
Concluzii	28
Bibliografie	29

Cuvinte cheie: radicali liberi, antioxidanți, capcane de spin, radicali nitroxidici, spectroscopie de rezonanță electronică de spin (RES), iradiere gama.

Introducere

Spre sfârșitul anilor 1950 noțiunile de radicali liberi și antioxidanți, erau aproape necunoscute în științele biologice și clinice, prezența radicalilor în materiale biologice fiind demonstrată abia în 1954. Pentru prima dată în 1956 s-a făcut legătura între efectele toxice ale nivelurilor crescute de oxigen în organismele aerobe și radiațiile ionizante, propunându-se ideea că toxicitatea oxigenului este datorată formării de radicali liberi.

În prezent, se cunoaște faptul că radicalii liberi joacă un rol important în etiologia multor boli precum și în multe fenomene inexplicabile anterioare apariției bolii. Astfel, câteva dintre afecțiunile în care radicalii liberi au o influență majoră sunt boala Alzheimer, hipertensiunea arterială, ischemia miocardică, ateroscleroza și carcinogeneza.

Din aceste motive, „măsurarea” cantității și a tipului de specie radicalică generată în diferite procese, este de o importanță majoră. Tehnica ce poate fi utilizată pentru a detecta direct aceste specii paramagnetice este Spectroscopia de Rezonanță Electronică de Spin (RES). Cu toate acestea, chiar și această tehnică are limitările ei, măsurarea directă nefiind întotdeauna posibilă datorită timpului de viață foarte scurt al unor radicali. O modalitate de a depăși acest neajuns este folosirea tehnicii RES a capcanelor de spin („spin traps”). În această tehnică, un compus diamagnetic, capcana de spin, se adaugă sistemului înaintea formării radicalilor ce urmează a fi detectați, capcana formând un radical intermediar numit spin aduct, care este mai puțin reactiv decât radicalul inițial dar care păstrează caracteristicile radicalului captat.

O altă metodă de studiu a radicalilor liberi instabili este cea a radicalilor nitroxidici, numiți și markeri de spin (“spin labels”). Caracteristica principală a radicalilor nitroxidici este dată de existența unui centru paramagnetic stabil format dintr-un electron neîmperecheat localizat pe legătura dintre un atom de azot și oxigen. Markerii de spin sunt utilizați în special pentru studiul dinamicii moleculare în sisteme biologice, studiul fenomenelor de interfață în sisteme coloid dar și pentru analiza caracterului antioxidant al unor vitamine, minerale și alți compuși precum extractele naturale.

Pe de altă parte, este cunoscut în lumea cercetării științifice în domeniu, faptul că studiile asupra efectelor radiației ionizante de înaltă energie (radiații gama, fascicule de electroni etc.) asupra sistemelor medicale și medicamentelor sau alimentelor sunt în continuă dezvoltare datorită multiplelor aplicații, în sterilizarea medicală și calitatea igienică a alimentelor. Prin utilizarea radiației ionizante însă, este posibilă modificarea sau degradarea sistemelor biomedicale, generându-se radicali liberi. Metoda de detecție RES reușește și în cazul acestor sisteme să pună în evidență o serie de proprietăți intime legate de structura electronică a defectului paramagnetic format în rețeaua solidului iradiat.

În lucrarea de față a fost utilizată spectroscopia RES ca metodă de studiu a radicalilor liberi generați în diferite sisteme. Sunt prezentate rezultatele experimentale obținute prin metoda RES directă asupra unor sisteme de interes biomedical iradite gama ca: medicamente

antineoplazice (purinethol), medicamente antidiabetice (clorhidratul de metformin), precum și a unor rășini dentare (dimetacrilat trietilenglicol bisfenol A) iradiate cu radiație vizibilă. S-a urmărit dacă aceste sisteme conțin sau pot forma ușor specii paramagnetice stabile, în urma sterilizării cu radiație γ , respectiv a vitrificării cu radiație vizibilă. Rezultatele experimentale demonstrează faptul că fotopolimerizarea rășinilor dentare de tipul celor analizate implică formarea de radicali polimerici ai derivaților metacrilici stabili în timp, concentrația acestora fiind dependentă atât de sistemul inițiator cât și de amestecul de monomeri utilizați în obținerea rășinilor compozite.

Măsurătorile RES ale pulberilor de *Purinethol* și *Clorhidrat de metformin* iradiate cu radiații gama demonstrează prezența mai multor specii paramagnetice stabile, a căror concentrații relative depind de doza absorbită. În urma fitării și simulării spectrelor experimentale au fost identificați și caracterizați radicalii generați în urma iradierii cu radiații γ în medicamente.

Prin spectroscopie RES indirectă, utilizând metoda capcanelor de spin, s-a urmărit identificarea și caracterizarea radicali liberi generați în sisteme precum: Fenton, xantin-xantin oxidază, superoxidul de potasiu. Radicalii hidroxil generați în *reacția Fenton* au fost detectați și caracterizați prin spectroscopie RES de joasă și înaltă frecvență (bandă X și bandă W), utilizând capcana de spin PBN (N-terț-butil- α -fenilnitronă). A fost determinată concentrația optimă de capcană care poate fi utilizată pentru detecția radicalilor din sistem și metode de creștere a sensibilității de detecție prin extracție organică și concentrarea spin aducțiilor.

Datorită rolului important al radicalului superoxid în deteriorarea celulară, au fost căutate metode adecvate de măsurare a acestuia, folosind capcane relativ noi, precum DEPMPO(5-dietoxifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oxid) sau DIPPMPPO (5-diizopropoxifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oxid), utilizând diferite sisteme generatoare de superoxid, precum sistemul xantin-xantin oxidază și superoxidul de potasiu. În cazul sistemului xantin-xantin oxidază au fost detectați și caracterizați radicalii superoxid generați de acest sistem utilizând trei tipuri de capcane de spin: DMPO, DEPMPO, DIPPMPPO. S-a urmărit determinarea condițiilor optime de detecție a radicalului superoxid, cu scopul de a fi analizat prin spectroscopie RES de joasă și înaltă frecvență. Au fost caracterizați radicalii superoxid și hidroxil generați de superoxidul de potasiu în soluție alcalină folosind capcana de spin DEPMPO. S-a constatat faptul că stabilitatea spin aducțiilor este puternic dependentă de raportul dintre cantitatea de superoxid de potasiu din soluție și cantitatea de capcană de spin utilizată.

Prin metoda RES indirectă utilizând radicalul nitroxidic Tempol a fost caracterizată capacitatea antioxidantă a unor sucuri naturale de mere și struguri, respectiv al unor extracte de semințe de struguri și *Calluna Vulgaris* (iarbă neagră).

Pentru caracterizarea activității antioxidante și pentru evaluarea autenticității unor *sucuri comerciale necarbogazoase de mere și struguri*, acestea au fost comparate cu sucuri proaspete de mere și struguri, calitatea și autenticitatea sucurilor comerciale fiind un subiect important în cercetare cu o relevanță semnificativă pentru siguranța industriei alimentare și protecția consumatorilor. Concluzia generală a acestui studiu a fost că sucurile comerciale analizate au

calitate similară cu a sucurilor proaspete, astfel că acestea sunt corect etichetate (ca fiind naturale), chiar dacă există o mică diferență între ele.

S-a urmărit în continuare evaluarea efectelor fotochemoprotective ale extractelor de semințe de struguri (soiul Burgund Mare-BM) și iarbă neagră (*Calluna Vulgaris*-CV), după expuneri multiple la radiații UVB a pielii șoarecilor albinoși SKH-1. Deoarece s-a demonstrat că aplicarea topică a acestor extracte pe pielea șoarecilor SKH-1 înainte de expunerea la o singură iradiere UVB reduce considerabil peroxidarea lipidică și producerea oxidului nitric în acest studiu s-au urmărit modificările adaptive ce implică stresul oxidativ, respectiv protecția antioxidantă a extractelor aplicate înainte sau după iradieri multiple. Rezultatele asupra ambelor extracte, sugerează faptul că aplicarea topică a extractelor de BM sau CV, suprimă considerabil deteriorările induse de expunerea multiplă la radiații UVB, prin inhibarea vătăărilor ADN și apoptozei.

Activitatea antioxidantă a extractelor a fost evaluată prin monitorizarea concentrației de Tempol după adăugarea extractelor și comparată cu cea a acidului galic. S-a constatat că ambele extracte au activitate antioxidantă mai slabă decât a acidului galic; de asemenea, prin compararea ratelor cinetice de reducere, s-a stabilit că extractul de BM are un caracter antioxidant ușor mai puternic decât cel de CV, de aceea este de așteptat ca BM să fie mai eficient în blocarea reacțiilor în lanț produse de speciile reactive ale oxigenului în pielea expusă la radiații UVB.

I. Caracterizarea și generarea radicalilor liberi

I.1 Caracterizarea radicalilor

Radicalii (adesea, dar inutil denumiți și radicali liberi) sunt o specie chimică ce posedă un electron neîmperecheat în învelișul exterior al moleculei, motiv pentru care sunt foarte reactivi chimic (Fig.I.1.).

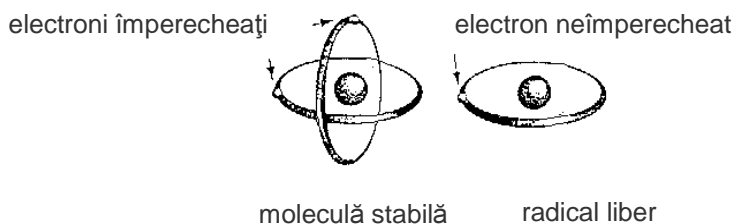


Fig.I.1 Structura radicalului liber (Reiter & Jo Robenson 1995)

Clasificarea radicalilor se poate face după diverse criterii, o clasificare care să includă marea majoritatea radicalilor ar fi următoarea [1]:

- Radicali liberi ai oxigenului
- Radicali liberi ai azotului
- Compuși aromatici
- Compuși de tip chinonic și semichinonic
- Acizi nucleici
- Radicalul thiil

I.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. Sursele interne de radicali liberi sunt procesele metabolice din organism sau/și mai ales procesele ce însoțesc perturbările metabolice asociate diferitelor tipuri de patologii (stres metabolic). Sursele externe de radicali liberi (Fig.I.2) includ radiațiile ionizante, radiațiile UV și microundele, metalele toxice (ex. Al și Cd din apa potabilă), smogul, aditivii alimentari chimici, fumul de țigară, poluanții atmosferici (în special compușii cu plumb).

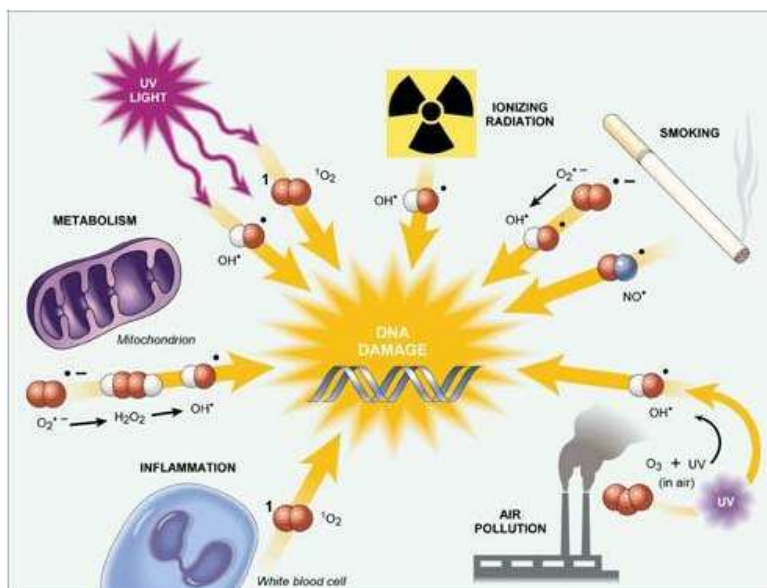


Fig. I.2. Surse generatoare de radicali liberi

(<http://www.thefoodadvicecentre.co.uk/reference/free-radicals/>)

I.2.1 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. Homoliza, poate fi termică, cuplată sau prin transfer electronic.

I.2.2 Fotoliza și radioliza

Radiațiile ionizante precum și absorbția luminii favorizează producerea unor mari cantități de radicali liberi, în funcție de doza de radiații absorbite și de timpul de expunere. Radicalii liberi sunt formați cel mai adesea, prin fotoliza legăturilor chimice ca urmare a absorbției unui foton, și trecerii moleculei într-o stare excitată de singlet sau triplet.

Radiațiile ionizante produc radicali și după încetarea expunerii prin efect indirect, datorită radiolizei apei din țesuturi. Radioliza apei depinde de natura și energia radiației precum și de prezența oxigenului, deoarece în lipsa oxigenului, radiațiile X și γ nu descompun apa.

I.2.3 Reacțiile enzimatic

Enzimele numite și fermenți, sunt substanțe naturale produse doar de către celulele vii îndeplinind rolul de biocatalizatori. Reacțiile enzimatic din organism dau naștere la radicali liberi intermediari ce reacționează între ei sau cu alte substanțe formând compuși stabili.

I.2.4 Metabolizarea

Metabolismul reprezintă totalitatea transformărilor biochimice și energetice ce au loc în țesuturile organismelor vii. Compușii chimici „străini” aflați în organism, numiți xenobiotice (medicamente, poluanți, pesticide ș.a.), sunt metabolizați, produșii secundari ai metabolizării fiind radicalii liberi.

I.2.5 Radicali liberi existenți în natură

Azotul și mai ales oxigenul existenți în atmosferă formează destul de ușor radicali liberi specifici. Deși ozonul (O_3) existent în natură, nu este un radical liber, este un agent oxidant foarte puternic. De asemenea, NO și NO_2 existenți în natură, sunt radicali liberi stabili în concentrații relativ mici (0,2 ppm NO_2 în smog). Flavin chinonele reprezintă o grupă din marea clasă a semichinonelor (SQ), care pot forma radicali liberi intermediari între formele oxidate și cele reduse ale chinonelor.

I.2.6 Generarea SRO în organismele vii

Radicalii cei mai relevanți apăruiți în procesele de reglare biologică sunt superoxidul (O_2^{\bullet}) și oxidul nitric (NO^{\bullet}). Procesul de formare al anionului superoxid este fie mediat de enzime, cum ar fi NAD(P)H oxidaza și xantin oxidaza, sau fie nonenzimatic cu compuși redox reactivi, cum ar fi compusul semi-ubiquinonă al lanțului mitocondrial de transport de electroni (Fig. I.3). Superoxid dismutazele (SODs) convertesc superoxidul enzimatic în peroxid de hidrogen [2,3]. În prezența metalelor de tranziție reducătoare (de exemplu, ioni de fier sau cupru), peroxidul de hidrogen pot fi redus la o specie radicalică foarte reactivă, radicalul hidroxil [3].

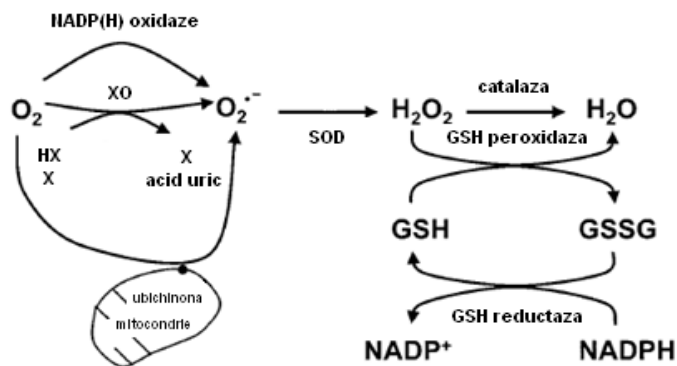


Fig. I.3 Căile de producere și înlăturare a SRO în organismele vii (X-xantină, XO-xantin oxidază, HX-hipoxantină, GSH-glutation, GSSG-glutation disulfid) [4]

II. Metode de detecție a radicalilor liberi

Există numeroase metode de detecție și măsurare a radicalilor liberi, directe sau indirecte, utilizabile pentru sisteme simple de reacții.

Printre metodele *indirecte* se numără spectrofotometria și chemiluminiscenta.

II.1 Spectrofotometria

Spectrofotometria este cea mai veche metodă, adesea indispensabilă identificării unui radical liber din mai multe posibilități de formare, utilizând reactivi specifici; metoda se bazează pe cuantificarea efectului de inhibiție pe care un radical liber îl exercită față de maximum de absorbție al reactivilor specifici utilizați prin urmărirea consumului de specie oxidantă.

II.2 Chemiluminiscenta

Chemiluminiscenta însoțește de multe ori reacții sau procese generatoare de radicali liberi; principiul metodei constă în emisia de lumină ca urmare a unor reacții între radicalii liberi și o substanță inserată în sistem, cea mai utilizată fiind luminolul. Intensitatea semnalului detectat este proporțională cu cantitatea de radicali liberi care au generat reacțiile cu o cantitate stabilită de luminol.

Metodele *directe* caută să înregistreze chiar radicalii liberi apăruiți în cursul unei reacții, una dintre aceste metode fiind *rezonanța electronică de spin* (RES).

II.3 Rezonanța electronică de spin (RES)

Spectroscopia RES are la bază tranzițiile induse între nivelele Zeeman ale unui sistem paramagnetic, adică ce posedă un electron neîmperecheat în structura învelișului electronic, aflat într-un câmp magnetic static [5-6].

Există o mare varietate de tehnici RES, fiecare dintre acestea cu propriile avantaje. În cazul spectroscopiei RES în undă continuă (CW-EPR), proba aflată într-un câmp magnetic static, este iradiată cu un fascicul continuu de microunde având o frecvență fixă, câmpul magnetic fiind baleiat de o parte și alta a condiției de rezonanță. Pot fi utilizate diferite frecvențe ale radiației de microunde, numite benzi: banda S (3.5 GHz), banda X (9-10 GHz), etc. după cum se specifică în tabelul II.1.

T **Tabelul II.1** Domenii de frecvențe utilizate în RES

Banda	Frecvența (GHz)	Lungimea de undă (mm)
L	1	300
X	9-10	30
K	24	12.5
Q	35	8.5
W	95	3.2
D	140	2.1

Spectroscopia RES poate să pună în evidență o serie de proprietăți intime legate de structura electronică a unui defect paramagnetic format în rețeaua unui solid iradiat, poate fi folosită și pentru studiul mecanismului de radioliză, permite identificarea speciilor radicalice induse de către radiații în produsele studiate [7-10]. Altă utilitate a metodei RES constă în studiul caracterului antioxidant al unor substanțe sau extracte, folosind metoda radicalilor nitroxidici [26-29].

II.3.1 Tehnici de măsurare RES

Experimentele RES prezentate în lucrare au fost efectuate cu scopul evidențierii și caracterizării radicalilor liberi din diferite sisteme biomedicale și biofarmaceutice. Spectrele RES în bandă X (9-10 GHz) au fost înregistrate cu un spectrometru BRUKER-BIOSPIN EMX^{micro}, echipat cu un sistem de achiziție a datelor pe calculator. Probele analizate au fost introduse în tuburi capilare de quartz, Wilmad-labglass, având diametrul interior de 1 mm și lungimea de 10 cm, tuburile fiind apoi poziționate în centrul cavității rezonatorului de tip TE₁₀₂.

Adițional, când câmpul magnetic utilizat în banda X nu era suficient de intens pentru a rezolva anizotropia factorului g, măsurătorile au fost efectuate în câmp înalt (~3 T). Aceste măsurători au fost realizate cu ajutorul unui spectrometru în banda W (3.4 T, 95 GHz) construit în laboratorul de biofizică al Universității Osnabrück (Germania), echipat cu o cavitate de tip TE₀₁₁. Probele au fost introduse în capilare de quartz cu diametrul interior de 0,6 mm (VitroCom Inc., N.J., USA) pentru măsurătorile la temperatură joasă, respectiv 0,2 mm în cazul măsurătorilor la temperatura ambientală [30].

II.3.2 Metode de detecție RES a radicalilor liberi

Radicalii liberi pot fi detectați prin spectroscopie RES, fie direct, fie indirect în funcție de stabilitatea și mobilitatea acestora precum și de faza sistemului în care sunt generați.

Astfel, în sisteme solide, radicalii liberi pot fi detectați **direct**, datorită capacității lor scăzute de recombinare [10]. În cazul radicalilor liberi din sisteme în fază gazoasă sau lichidă, detecția se face prin metode **indirecte**, datorită timpului de viață foarte scurt (de ordinul microsecundelor) al acestora. În acest sens, este necesar să se folosească un reagent diamagnetic din clasa nitronelor numit “*capcană de spin*” (“spin trap”) [12, 13] sau “*radicali nitroxidici*”, numiți și “*markeri de spin*” (“spin labels”) [11].

II.3.2.1 Aplicații ale capcanelor de spin în analiza RES a unor sisteme

Metoda capcanelor de spin (EPR/ST) este o tehnică în care un radical liber este captat indirect, după ce acesta reacționează cu un compus diamagnetic cu dublă legătură (capcana de spin); se

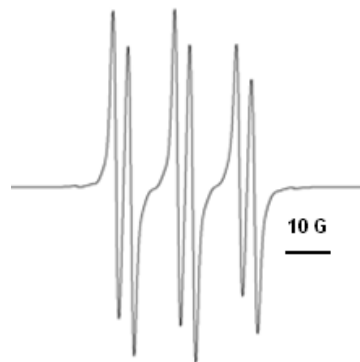


Fig. II.1 Spectrul RES al spin aductului PBN-OH

formează astfel un radical intermediar mai puțin reactiv numit spin aduct.

PBN (N-terț-butil- α -fenilnitronă) este printre primele capcane sintetizate. Cu excepția trifenilmetilului, formează spin aducți cu toate tipurile de radicali, dar diferențele între constantele de desplicare hiperfină pentru diferiți radicali captați pot fi foarte mici, motiv pentru care nu pot fi diferențiați. Spectrul RES al aductului format cu PBN, va conține 6 linii. (Fig. II.1).

Datorită lipsei de specificitate a PBN-ului, Janzen și Liu au sintetizat în 1973 o capcană nouă, ciclică, **DMPO** (5,5-dimetil-1-prolin-N-oxid). În cazul acesteia, valorile $a_{H^{\beta}}$ sunt mai mari și mult mai sensibile la natura radicalului captat. Spectrul RES al aductului DMPO-OH ce are $a_N \approx a_H = 14.85$ G, are structură de patru linii cu intensitățile 1:2:2:1. (Fig. II.2 (a)), liniile centrale fiind suprapuse. În cazul aductului DMPO-OOH liniile se desplică atât datorită nucleului de azot cât și datorită protonilor din pozițiile β și γ (Fig. II.2 (b)).

Un derivat al DMPO-ului este **DEPMPO** (5-dietoxifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oxid) [20-23]. Datorită fosforului ^{31}P ($I=1/2$) care induce desplicări suplimentare în spectrele RES, acestea vor fi mult mai complexe, dar, mai informative în comparație cu cele ale aducților de DMPO [22-25] (Fig. II.3).

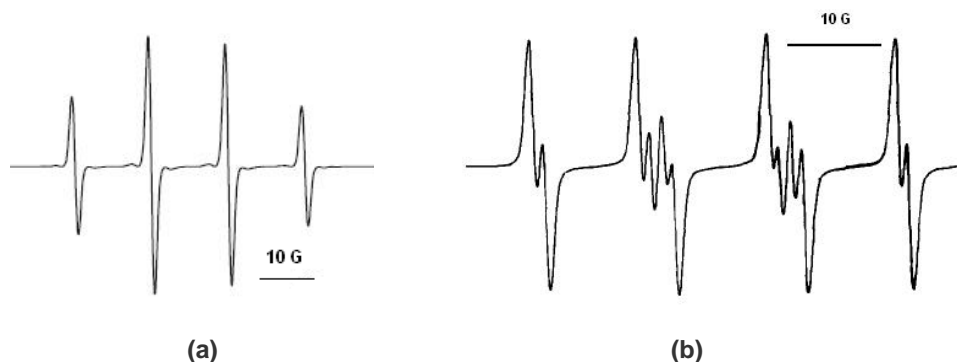


Fig. II.2 Spectrul RES al spin aducților DMPO-OH (a) respectiv DMPO-OOH (b)

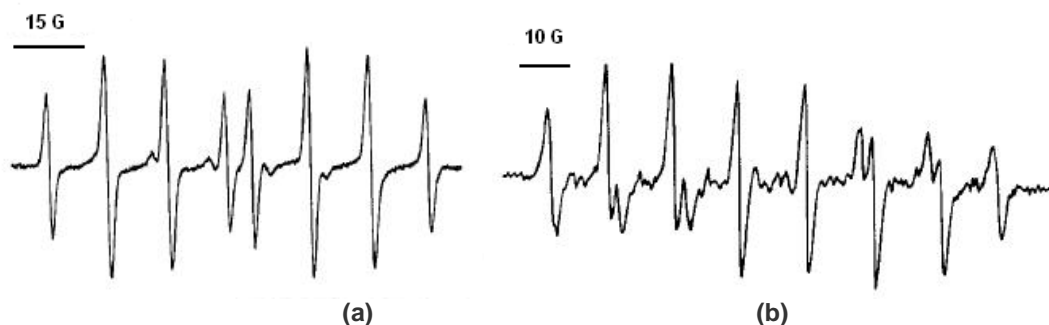


Fig. II.3 Spectrul RES al spin aducților DEPMPO-OH (a) respectiv DEPMPO-OOH (b)

II.3.2.2 Aplicații ale radicalilor nitroxidici în studiul RES al unor sisteme

În ultimele decenii, spectroscopia RES a radicalilor nitroxidici a cunoscut o dezvoltare considerabilă, deoarece spectrele lor RES conțin informații despre unele caracteristici ale micro-mediului molecular din vecinătate, cum este polaritatea, cât și despre mobilitatea și natura orientărilor sau mișcările moleculare [11]. În cazul radicalilor nitroxidici, localizarea electronului paramagnetic, predominant pe atomul de azot este responsabilă de interacțiunea hiperfină cu nucleul de ^{14}N a cărui spin nuclear este $I=1$ conducând la o desplicare hiperfină a liniilor Zeeman în $2I+1=3$ componente. În consecință spectrul RES al va avea trei linii spectrale (fig. II.4), forma spectrelor fiind influențată de mobilitatea moleculei.

Câteva dintre numeroasele aplicații ale radicalilor nitroxidici în investigația RES sunt: studiul fenomenelor de interfață care au loc în sistemele coloid, mobilitatea moleculelor marcate prin spectroscopie RES, detectând schimbările care au loc în ordonarea compușilor membranari marcați [16], analiza caracterului antioxidant al unor vitamine, minerale și alți compuși fotochimici [17].

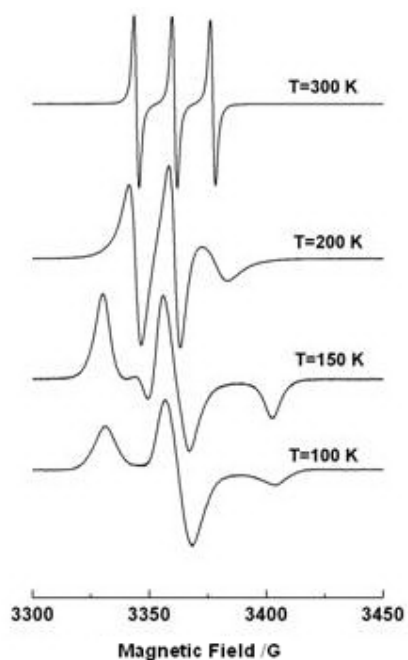


Fig. II.4 Spectrele RES ale radicalului nitroxidic Tempol, la diferite temperaturi

III. Detecția directă prin spectroscopie RES a radicalilor liberi generați în unele sisteme biofarmaceutice

Rășinile compozite fotopolimerice sunt utilizate frecvent în stomatologie ca materiale pentru restaurarea dinților anteriori și posteriori, ca plombe dentare și în stomatologia prostetică pentru prepararea smalțurilor dentare [31, 32]. În timpul fotopolimerizării monomerilor de dimetacrilat apar în rețea radicali liberi și monomeri rămași nepolimerizați aceștia afectând proprietățile mecanico-fizice și biocompatibilitatea materialului compozit [33].

Metoda iradierii cu radiații gamma a fost propusă în Farmacopeea britanică atât pentru sterilizarea medicamentelor cât și a anumitor materiale chirurgicale și echipamente, cu o doză maximă de 25 kGy . Deși este o metodă promițătoare, în urma interacțiunii dintre radiațiile gama și substanță, se pot forma radicali liberi care sunt prinși în matricea cristalelor. Testarea stresului indus prin iradierea γ în medicamente, poate oferi informații cu privire la căile de degradare și stabilitatea intrinsecă a moleculei.

III.1 Rășini dentare

Au fost studiate șase rășini dentare compozite utilizând un amestec diferit de doi monomeri de tipul Bis-GMA (dimetacrilat trietilenglicol bisfenol A): hidroxietil metacrilat (HEMA) și dimetacrilat uretan (UDMA) (Fig. III.1).

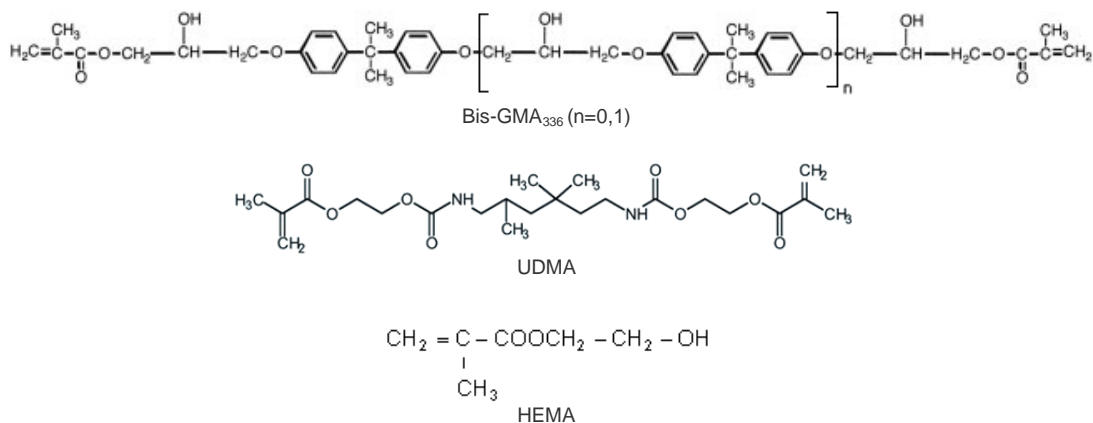


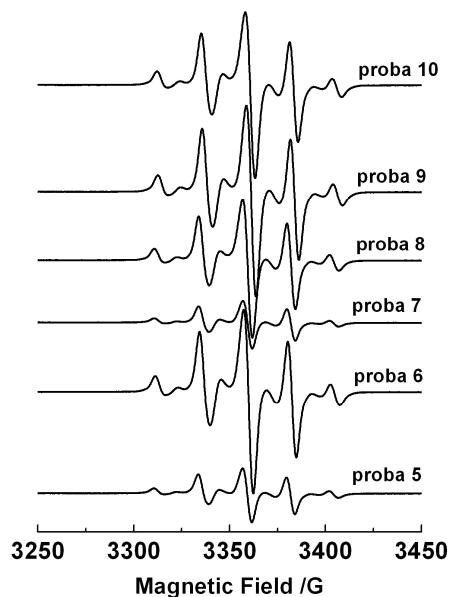
Fig. III.1 Structura chimică a monomerilor metacrilat utilizați

Compoziția rășinilor compozite experimentale este prezentată în tabelul III.1.

Tabelul III.1 Compoziția rășinilor experimentale

Amestec de monomeri + filer hibrid (% m/m) / Sistem de inițiere (% m/m)	- Bis-GMA ₃₃₆ (12) - HEMA (8) + - cuarț (32) - Sr/Zr (32) - FHap (16)	-Bis-GMA ₃₃₆ (7) -UDMA (3) -HEMA (10) + - Quartz (32) - Sr/Zr (32) - FHap (16)
-CQ - DMAEM	proba 5	proba 7
- CQ - - DMAEM - E-4-DMAB	proba 6	proba 8
- CQ - - E-4-DMAB	proba 9	proba 10

După preparare, probele compozite au fost vitrificate prin expunere la radiație vizibilă. Spectrele RES în banda X la temperatura camerei evidențiază prezența radicalilor polimerici ai derivaților metacrilici (Fig. III.2) formați ca urmare a vitrifierii sistemelor.

**Fig. III.2** Spectrele RES ale rășinilor compozite după iradiere

Cinetica formării radicalilor în funcție de timpul de expunere la radiații a fost caracterizată determinând concentrația relativă a radicalilor pentru diferite perioade de iradiere (Fig. III.3). Concentrația de radicali din probe a fost evaluată prin monitorizarea dublei integrale normalizate a semnalului RES, utilizând programul Origin 8 [10]. Se constată din analiza curbei o creștere a concentrației relative de radicali liberi pe parcursul procesului de polimerizare a probelor, după aproximativ trei minute însă intervenind fenomenul de saturație.

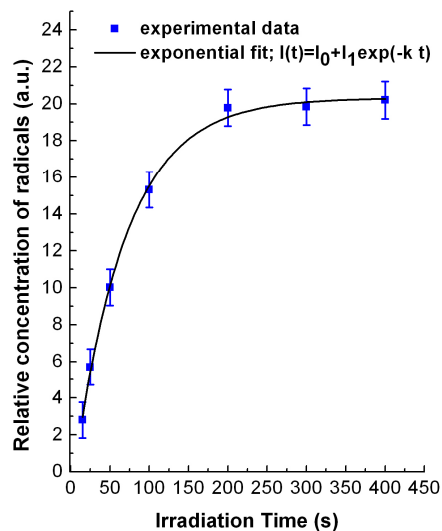


Fig. III.3 Dependenta intensității relative a semnalului RES de timpul de iradiere

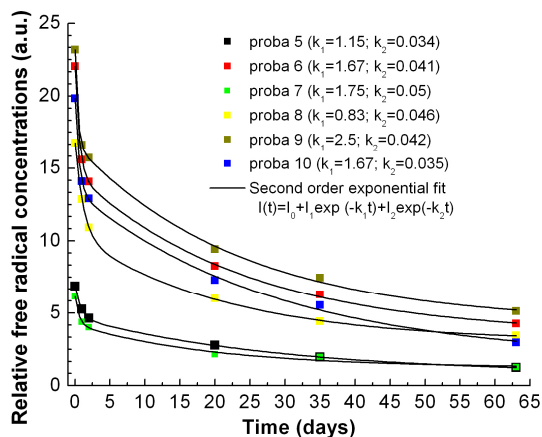


Fig. III.4 Variația în timp a intensității relative a semnalului RES

Pentru a determina stabilitatea în timp a radicalilor formați în procesul de polimerizare, în figura III.4 a fost reprezentată variația în timp a intensității semnalului RES. Se observă tendința generală de scădere a concentrației relative de radicali liberi în timp. Sumarizând rezultatele, se poate conchide faptul că fotopolimerizarea rășinilor dentare de tipul celor analizate implică formarea de radicali liberi stabili în timp, concentrația acestora fiind dependentă atât de sistemul inițiator cât și de amestecul de monomeri utilizați în obținerea rășinilor compozite [34].

III.2 Purinethol

Purinetholul [1,7-dihydro-6H-purine-6-thione, $C_5H_4N_4SxH_2O$] sau 6-mercaptapurina, este un agent antineoplazic ce se administrează în chimioterapie, pentru tratarea leucemiei acute și a leucemiei granulocitare cronice. Purinetholul sub formă de pulbere microcristalină (GlaxoSmithKline, United Kingdom) a fost expus la radiații γ într-o sursă de ^{60}Co (GAMMA CHAMBER 900) în condiții ambientale. Doza de radiații absorbită de probe a fost cuprinsă în intervalul 0 – 25 kGy [35]. Au fost detectați și caracterizați prin spectroscopie RES radicalii induși de radiații în probe. Spectrele RES au fost înregistrate la temperatura camerei în banda X (9-10GHz), cu o modulație a câmpului de 100 KHz (Fig. III.5).

Pentru determinarea parametrilor magnetici specifici, spectrul experimental a fost simulat cu programul POWFIT. Spectrul pare să aparțină în principal radicalului sulfinil $RSO\cdot$ cu parametrii spectroscopici $g_{zz}=2.0232$ și $g_{xx}=g_{yy}=2.0048$ format prin oxidarea radicalului thyl. În afara radicalului thyl, mai există două specii paramagnetice cu parametrii magnetici $g_1=1.998$ și $A_1 \approx 3$ G, și respectiv $g_2=2.002$ și $A_2 \approx 17$ G.

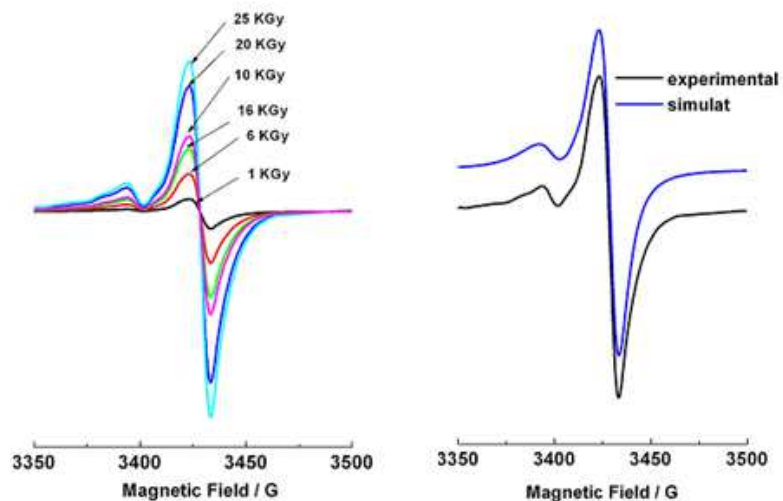


Fig. III.5 Spectrele RES experimentale și spectrul simulat ale purinetholului iradiat gama la diferite doze

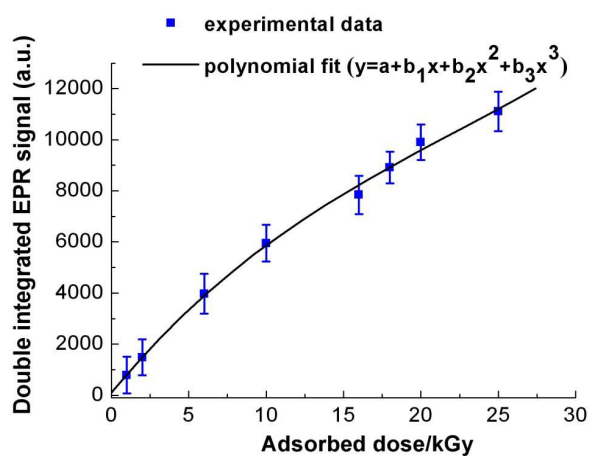


Fig. III.6 Curba doză-răspuns

Integrala relativă a intensității spectrului RES de absorbție (proporțională cu integrala dublă a semnalului RES normalizată per miligram de probă), în funcție de doza absorbită, reprezintă curba doză-răspuns (Fig. III.6).

Din analiza curbei se poate deduce faptul că iradierea cu radiație gamma a purinetholului determină o creștere a concentrației de radicali cu diferiți parametri de generare și recombinare [60].

III.3 Clorhidrat de metformin

Clorhidratul de metformin [1,1-dimethylbiguanide hydrochloride] utilizat în tratamentul diabetului zaharat de tip 2, este un antidiabetic care în prezența insulinei endogene sau exogene, produce o reducere a nivelului glucozei din sânge. Clorhidratul de metformin (Berlin Chemie,

Germany), a fost expus la radiații γ , doza de radiații absorbită de probe fiind cuprinsă în intervalul 0 – 4 kGy. Spectrul RES experimental al pulberii de metformin iradiat (Fig. III.7) este reprezentat de un triplet de linii largi, cu raportul intensităților 1:2:1, constatându-se și în cazul acestui medicament, o creștere a intensității semnalului RES cu doza de radiații absorbită.

Prin simularea și fitarea spectrului experimental au fost determinați parametri magnetici

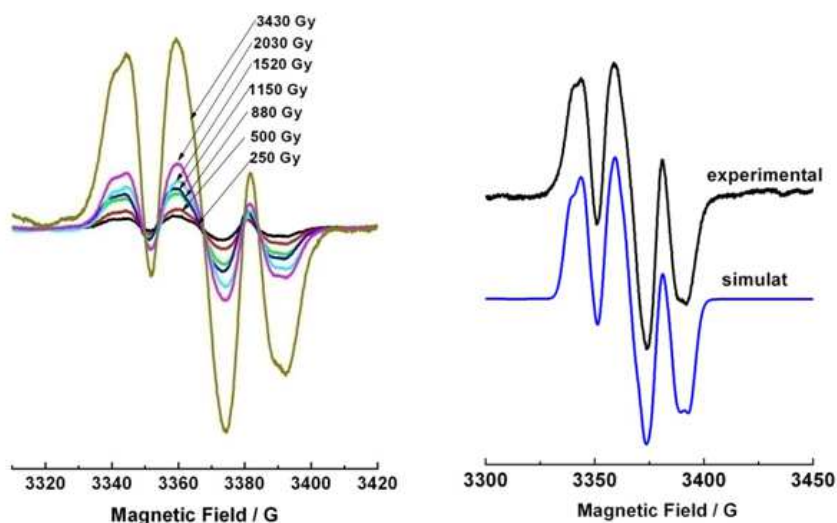


Fig. III.7 Spectrele RES experimentale și spectrul simulat ale metforminului iradiat la diferite doze

caracteristici. Factorul de desplicare spectroscopică a radicalilor și constanta de desplicare hiperfină a electronului liber cu protonii din vecinătate și cu nucleul de azot ^{14}N , arată existența a două specii radicalice magnetic neechivalente, având parametri:

- specia 1: $a_{\text{CH}_2} = 25,1 \text{ G}$, $a_{\text{NH}} = 6,8 \text{ G}$ și $a_{\text{N}} = 10,4 \text{ G}$, respectiv,
- specia 2: $a_{\text{CH}_2} = 18,5 \text{ G}$, $a_{\text{NH}} = 16,7 \text{ G}$ și $a_{\text{N}} = 6,4 \text{ G}$.

Spectrele RES experimentale ale pulberilor de metformin, iradiate la diferite doze, au fost folosite pentru generarea curbei doză-răspuns (Fig. III.8). Din analiza acestei curbe, se deduce faptul că iradierea cu radiație gamma a metforminului determină o creștere a concentrației de radicali, după o ecuație liniară. Această dependență a intensității semnalului RES de doza absorbită, demonstrează faptul că metforminul poate fi utilizat ca indicator biodozimetric [36].

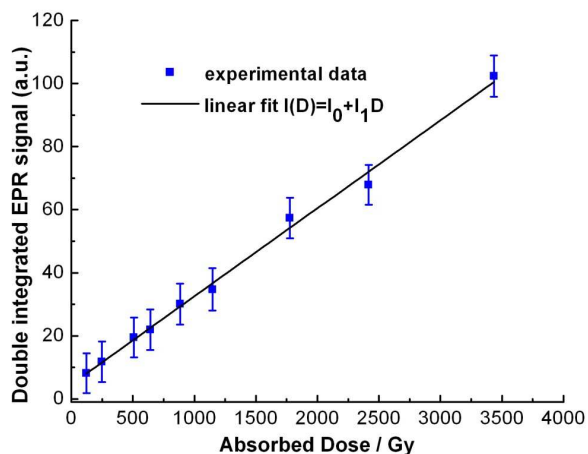


Fig. III.8 Curba doză-răspuns

IV. Detecția indirectă prin metoda „spin trapping” (ST/EPR) a radicalilor liberi generați în unele sisteme biomedicale

Identificarea radicalilor liberi cu timp de viață scurt, cum este spre exemplu cazul radicalilor hidroxil sau superoxid în sisteme chimice și biologice a devenit posibilă prin intermediul spectroscopiei RES utilizând metoda capcanelor de spin. Nici o altă tehnică utilizată *in vivo* nu s-a dovedit a fi la fel de sensibilă și specifică din punct de vedere analitic, pentru detecția radicalilor liberi [14, 15]. Sistemele alese pentru studiul radicalilor liberi, prin metoda capcanelor de spin, sunt reacția Fenton, sistemul biologic xantin-xantin oxidază și superoxidul de potasiu. Primul dintre acestea este un sistem care generează radicali hidroxil, al doilea radicali superoxid iar ultimul generează ambele tipuri de radicali.

IV.1 Reacția Fenton

Oxidarea substraturilor organice în prezența fierului (II) și a peroxidului de hidrogen este numită " reacție Fenton ". Deși natura speciilor oxidante obținute în reacția Fenton este încă un subiect de discuție, concluzia general acceptată este că mecanismul cel mai probabil pentru generarea radicalilor hidroxil (\bullet OH) foarte reactivi în sisteme biologice, este reacția Fenton, reacția fiind de asemenea capabilă să genereze stări de oxidare superioare ale fierului [37-40].

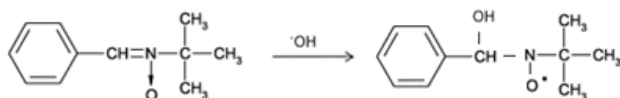


Fig. IV.1. Formarea spin aductului PBN-OH \bullet

Au fost detectați și caracterizați prin spectroscopie RES de joasă și înaltă frecvență (bandă X și bandă W), radicalii generați în reacția Fenton utilizând capcana de spin PBN (Fig. IV.1). După prepararea sistemului Fenton, utilizând diferite concentrații de PBN, au fost înregistrate spectrele RES în banda X la temperatura camerei.

Pentru determinarea concentrației optime de PBN a fost reprezentată curba dependenței intensității semnalului RES de concentrația de capcană (Fig. IV.2). Un domeniu optim al concentrației capcanei de

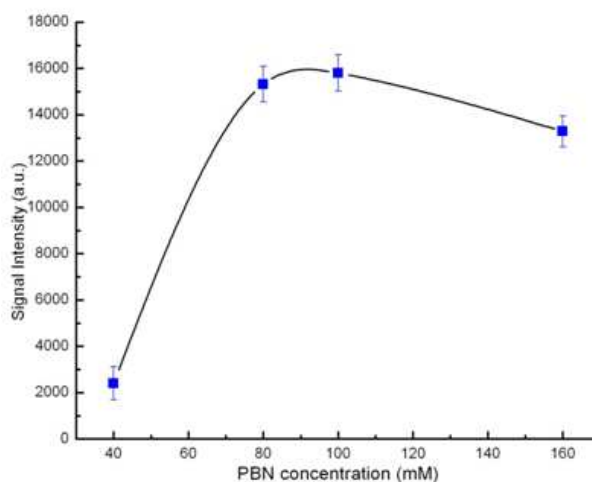


Fig. IV.2 Dependența intensității semnalului RES de concentrația de PBN

spin este cuprins între 80-100 mM.

Pentru creșterea concentrației de spini captați, s-a apelat la extracția organică a spin aducțiilor și concentrarea acestora. Avantajul extracției organice (cloroform/metanol, 2:1 vol.) constă în faptul că aductul este transferat într-un mediu cu constantă dielectrică mai mică (în cazul de față cloroform).

A fost înregistrat spectrul RES în bandă X la temperatura camerei; din analiza spectrului, au fost determinate constantele de despicare hiperfină izotropice corespunzătoare atomilor de azot și hidrogen: $a_N=15.266$ G respectiv $a_H=3.8$ G (Fig. IV.3).

Au fost înregistrare în continuare spectre RES în banda X la temperatura azotului lichid (Fig.IV.4). Se

observă din analiza spectrului, că anizotropia factorului de despicare hiperfină nu este complet rezolvată nici la temperatură joasă. Pentru a înlătura acest neajuns, în continuare au fost înregistrate spectrele RES la temperatură joasă în câmp înalt. Spectrele experimentale în banda W au fost simulate și fitate cu ajutorul programului EasySpin. Valorile tensorului g corespunzătoare radicalului hidroxil, obținute în urma simulării sunt: $g_{xx}=2.00916$, $g_{yy}=2.00614$, $g_{zz}=2.00221$ iar cele ale tensorului de despicare hiperfină: $A_{xx}=4.32$ G, $A_{yy}=4.67$ G și $A_{zz}=34.68$ G (Fig. IV.4). Se constată în concluzie că o metodă fiabilă și exactă de caracterizare a radicalilor generați în sisteme este metoda ST/EPR în câmp înalt.

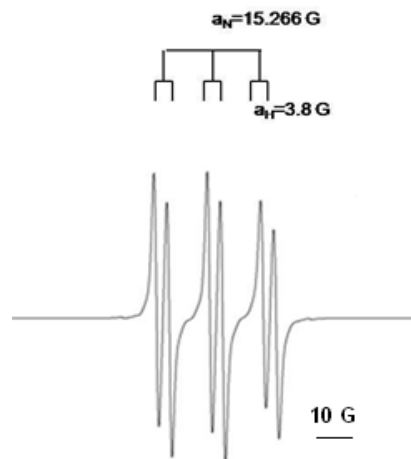


Fig. IV.3 Spectrul RES în bandă X, la temperatura camerei, al spin aductului PBN-OH[•]

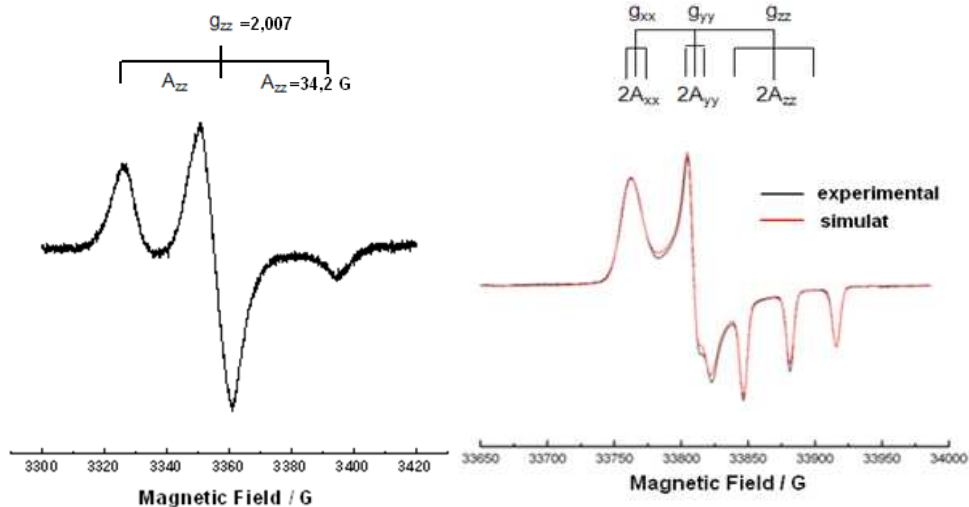


Fig. IV.4 Spectrele RES în bandă X și respectiv W, la temperatură joasă, ale spin aductului PBN-OH[•]

IV.2 Superoxidul de potasiu

Superoxidul de potasiu (KO_2) este un sistem puternic nucleofil, ce formează legături de hidrogen în apă suferind disproporționare rapidă în radicali de tip hidroperoxid HOO^\cdot și hidroxil HO^\cdot [44, 45]. Prin dizolvarea lui în solvenți organici aprotici precum dimetil sulfoxidul (DMSO), se obține anionul superoxid. S-a urmărit detectarea și caracterizarea radicalilor superoxid și hidroxil generați de superoxidul de potasiu în soluție alcalină folosind capcana de spin DEPMPO (Fig. IV.5).

Stabilitatea de 10 ori mai mare a spin aducțiilor de DEPMPO față de cei ai DMPO, determină

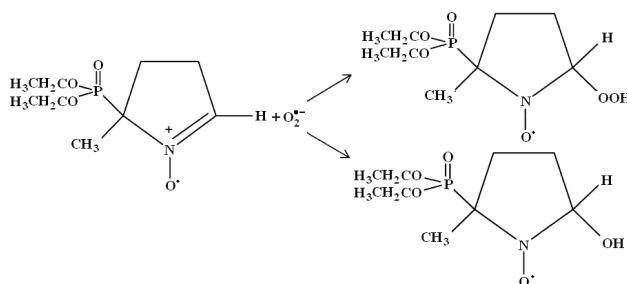


Fig. IV.5 Reacția de formare a spin aducțiilor DEPMPO- OH^\cdot și DEPMPO- OOH^\cdot

un raport semnal/zgomot mai mare în condiții experimentale identice. În plus, fosforul ^{31}P ($I=1/2$) determină despicări suplimentare, spectrele înregistrate fiind mai complexe, dar mult mai informative decât cele obținute folosind DMPO [23-25, 41].

Au fost preparate trei soluții (A, B, și C) cu rapoarte diferite între cantitatea de superoxid de potasiu din soluție și cantitatea de capcană de spin utilizată (1 μl KO_2 /10 mM DEPMPO- proba A, 10 μl KO_2 /15 mM DEPMPO- proba B, 20 μl KO_2 /20 mM DEPMPO- proba C).

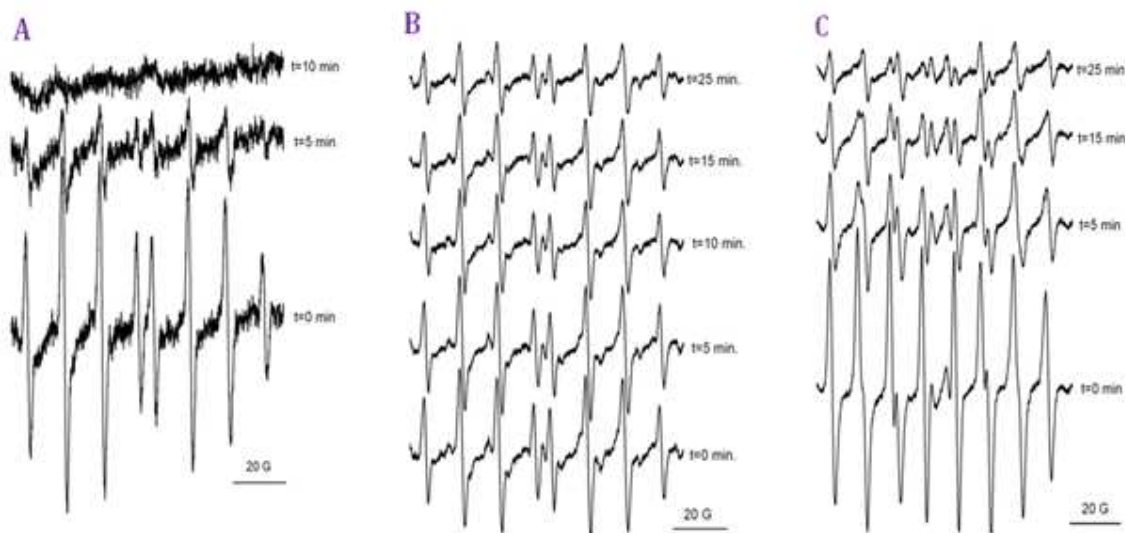


Fig. IV.6 Spectrele RES în banda X, la temperatura camerei, ale soluțiilor A, B și C

Achiziția spectrelor RES s-a făcut în bandă X la temperatura camerei, la aproximativ două minute de la inițierea reacției (Fig. IV.6).

Se constată din spectre faptul că se poate face distincție între spin aducții DEPMPO-OH și DEPMPO-OOH (Fig.IV.7).

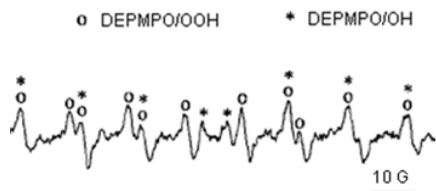


Fig.IV.7 Atribuirea peak-urilor spin aducților DEPMPO-OOH și DEPMPO-OH pe spectru

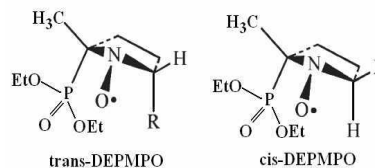


Fig.IV.8 Conformerii ai spin aducților DEPMPO-OOH și DEPMPO-OH

Constantele de desplicare hiperfină (a) ale aducților au fost determinate în urma simulării spectrelor experimentale pentru fiecare soluție în parte (Fig. IV. 9) [47], și au fost înregistrate în tabelul IV.1. Simularea spectrelor experimentale demonstrează existența a doi conformeri (cis și trans) (Fig. IV.8) pentru fiecare tip de spin aduct, între conformeri existând un schimb rapid [46].

Tabelul IV.1 Valorile constantelor de desplicare hiperfină ale aducților DEPMPO/OH și DEPMPO/OOH

a (G)	DEPMPO/OH				DEPMPO/OOH			
	proba A		proba B	proba C	proba A	proba C		proba B
	Conformer I	Conformer II				Conformer I	Conformer II	
a_N	14.12	14.04	14.53	14.4	-	13.01	13.07	13.07
a_H^{β}	13.26	13.28	14.07	13.26	-	10.63	11.15	9.22
a_P	50.4	50.62	51.38	47.42	-	49.46	50.68	49.6
$a_H^{\gamma}(1H)$	0.89	0.96	1.07	1.01	-	0.87	0.96	0.91
$a_H^{\gamma}(6H)$	0.43	0.44	0.39	0.41	-	0.34	0.41	0.48

După simularea spectrelor, s-a studiat evoluția în timp a acestora (Fig. IV.10). Se observă în cazul soluției A o degradare rapidă a aducților DEPMPO-OH. Curba înregistrată în cazul soluției B demonstrează o stabilitate mai mare în timp a spin aducților, iar în cazul soluției C spectrul scade mai rapid în intensitate decât în cazul soluției B, dar în același timp acesta își modifică și forma.

Acest fapt demonstrează o conversie a spin aductului DEPMPO-OOH în DEPMPO-OH odată cu creșterea cantității de oxigen din probă.

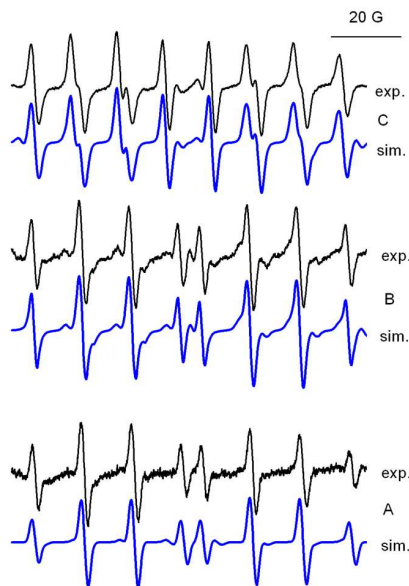


Fig IV.9 Spectrele experimentale și cele simulate pentru soluțiile A, B și C

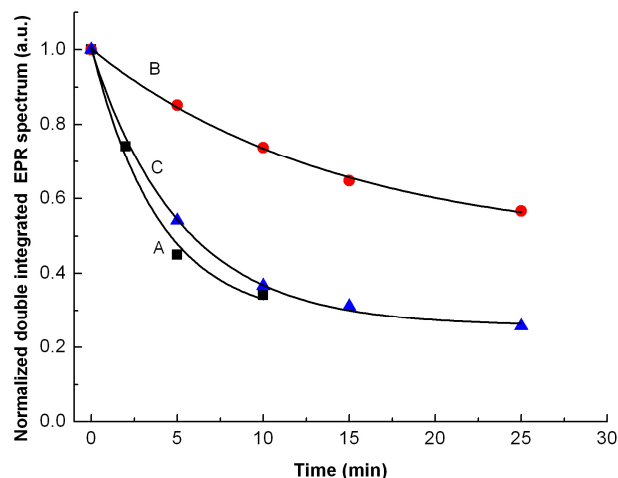


Fig. IV.10 Curbele de descompunere a spin aducțiilor, în cazul soluțiilor A, B și C

IV.3 Xantin-xantin oxidaza

Sistemul xantin-xantin oxidază prezintă o importanță biologică majoră, el generând specii reactive ale oxigenului. Au fost studiați radicalii generați de acest sistem utilizând trei tipuri de capcane de spin: DMPO, DEPMPO, DIPPMPPO. S-a urmărit determinarea condițiilor optime de detecție a radicalului superoxid, cu scopul de a fi analizat prin spectroscopie RES de joasă și înaltă frecvență. Cu DMPO și DEPMPO timpul de înjumătățire al spin aductului este foarte scurt (45 s respectiv 15 minute) [41-43], motiv pentru care măsurarea în banda W la temperatură joasă a fost imposibil de realizat.

Utilizând **DIPPMPPO** (5-diizopropoxifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oxid) și realizând extracția organică a spin aducțiilor (cloroform/metanol, 2:1 vol.) a fost posibilă înregistrarea spectrelor RES atât în banda X cât și în banda W (Fig. IV.11).

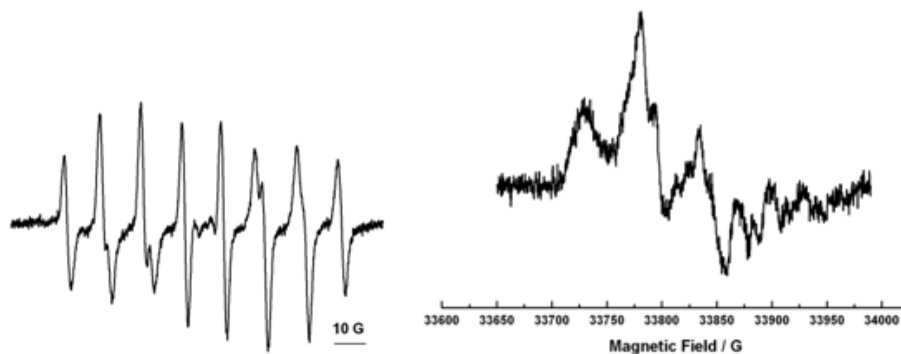


Fig. IV.11 Spectrele RES în bandă X și W ale spin aductului DIPPMPPO-OOH

V. Caracterizarea compușilor antioxidanți

V.1 Tipuri de antioxidanți

Pentru a preveni oxidarea și daunele provocate de concentrațiile în exces de radicali liberi generați în sistemele biologice, există mai multe grupuri de agenți antioxidanți dintre care amintim: antioxidanții enzimatici (enzimele), antioxidanții neenzimatici și compușii exogeni.

V.2 Stresul oxidativ

Radicalii liberi în general și speciile reactive ale oxigenului (SRO), azotului și clorului în particular, se crede că au o contribuție majoră în dezvoltarea mai multor boli legate de vârstă, și în procesul de îmbătrânire în sine [19, 48], prin provocarea "stresului oxidativ" și a "deteriorării oxidative".

Deoarece stresul oxidativ este implicat în variate afecțiuni patologice, se acordă o importanță deosebită metodelor de „cuantificare” a daunelor provocate, precum și a identificării compușilor ce pot atenua sau chiar eradica efectele acestuia. În acest sens, de o mare actualitate este studiul activității antioxidante a diverși compuși naturali și extracte naturale precum și ale produselor alimentare și a probelor biologice.

V.3 Determinarea activității antioxidante

O tehnică aplicată în ultimii ani pe scară largă pentru determinarea activității antioxidante, și studiul calității produselor este tehnica RES [26]. Astfel, o metodă aplicată frecvent în scopul asigurării calității produselor alimentare este tehnica RES utilizând **capcane de spin** precum PBN, DMPO, DEPMPO, POBN, etc. [49-53].

O altă metodă folosită frecvent în RES pentru determinarea activității antioxidante este utilizarea de radicali naturali stabilizați (**radicali nitroxidici**, Fig. V.1).

Există doi parametri distincți, care sunt determinabili din cinetica degradării : potențialul antioxidant și capacitatea antioxidantă [54] (Fig. V.2).

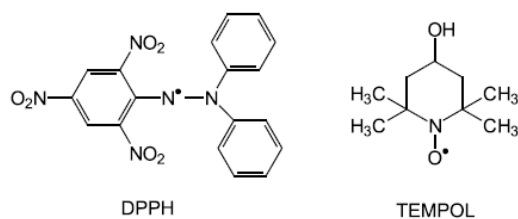


Fig. V.1. Structurile unor radicali sintetici stabilizați

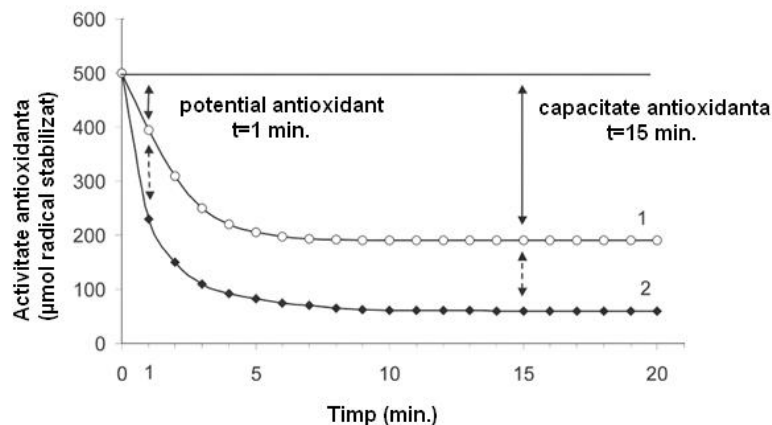


Fig. V.2 Cinetica unui radical sintetic degradat de două tipuri de antioxidanți 1 și 2.

Metoda RES este preferabilă altor tehnici (precum TEAC) datorită faptului că este mult mai specifică, ca urmare a formării de semnale caracteristice. Astfel, se poate face diferențierea între numeroase substanțe care contribuie la activitatea antioxidantă totală a unui compus, rezultând o evaluare mai precisă a activității antioxidante a compusului.

V.4 Rezultate asupra sistemelor studiate

Au fost efectuate studii RES privind activitatea antioxidantă a unor sucuri comerciale și naturale și a unor extracte naturale (semințe de struguri și *Calluna Vulgaris*) folosind radicalul nitroxidic Tempol (*2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine-oxyl*) [55, 56-57]. În urma oxidării acestuia, numărul de specii paramagnetice scade în timp cu diferite rate, în funcție de cantitatea de antioxidanți prezentă în probă și de potențialul antioxidant al acestora. Înregistrând scăderea semnalului RES în timp, se pot extrage concluzii referitoare la caracterul antioxidant.

V.4.1 Sucuri naturale și comerciale

A fost caracterizată activitatea antioxidantă și evaluată autenticitatea unor sucuri comerciale necarbogazoase de mere și struguri. Se observă (Fig. V.3) că intensitatea semnalului RES scade în timp ca urmare a interacțiunii nitroxidului cu complexul antioxidant prezent în sucuri (polifenoli și vitamine). Ratele de reacție dintre compușii antioxidanți și Tempol au fost monitorizate utilizând dubla integrală normalizată a semnalului RES (DIEPR), care este proporțională cu cantitatea de specii paramagnetice în timp (Fig. V.4).

Dubla integrare a semnalului, la diferite momente, a fost realizată prin utilizarea programului WIN EPR (Bruker Instruments). Comparând sucul proaspăt de mere cu sucul comercial, putem spune că cel proaspăt are caracter antioxidant puțin mai accentuat ($k_{\text{natural}}=0.02$, $k_{\text{comercial}}=0.035$), situația fiind similară și în cazul sucului de struguri ($k_{\text{natural}}=0.017$, $k_{\text{comercial}}=0.024$).

În termeni de activitate antioxidantă, putem conchide că sucurile comerciale analizate au calitate similară cu a sucurilor proaspete, astfel că acestea sunt corect etichetate, chiar dacă există o mică diferență între ele [18].

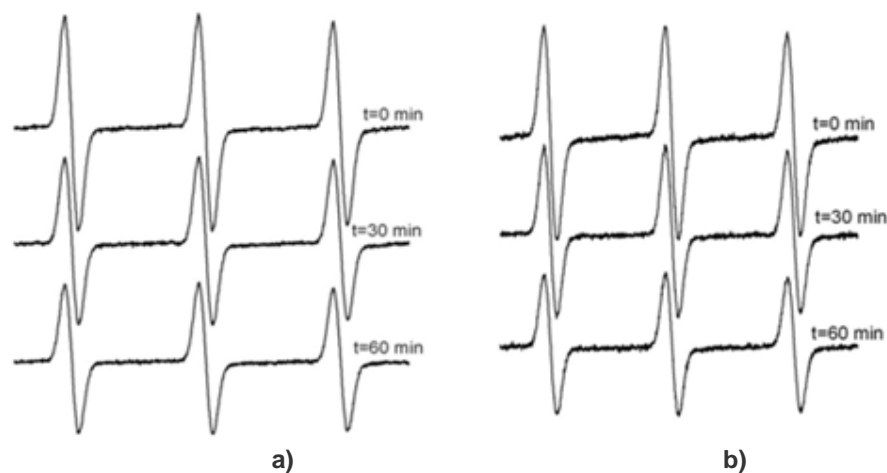


Fig. V.3 Spectrele RES ale timpului după diferiți timpi de incubare în suc natural de mere (a) și struguri (b)

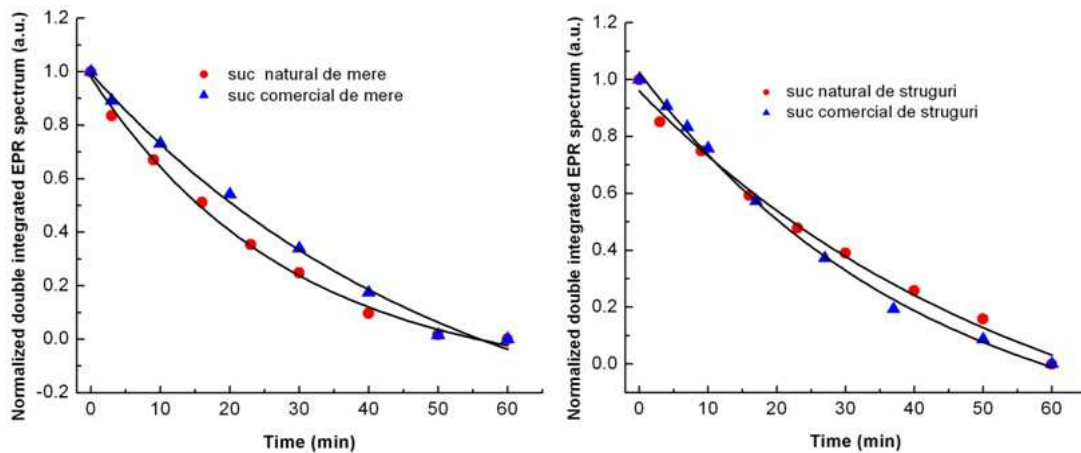


Fig. V.4 Dubla integrală normalizată a spectrelor RES pentru sucuri în funcție de timp.

V.4.2 Extracte naturale

Deoarece stresul oxidativ mediază apariția efectelor adverse ale radiațiilor la nivelul pielii, aportul regulat sau aplicarea topică de antioxidanți sunt considerate a fi utile reducerii efectelor vătămătoare ale expunerii la radiații. Din multitudinea de agenți cu rol fotochemoprotectiv, antioxidanții de origine vegetală par a fi cei mai promițători. Dintre aceștia, extractele de semințe de struguri și *Calluna Vulgaris* au constituit obiectul nostru de studiu.

Semințe de struguri (soiul Burgund Mare)

S-a urmărit evaluarea efectelor fotochemoprotective ale extractului de semințe de struguri [57], după expuneri multiple la radiații UVB. Cu acest scop, s-au analizat modificările adaptive ce implică stresul oxidativ, respectiv protecția antioxidantă și felul în care aplicarea topică a unui extract de BM pe pielea șoarecilor SKH-1, înainte sau după iradiere, poate inhiba vătămarea pielii prin modularea mecanismelor de protecție antioxidantă.

Activitatea antioxidantă a extractului a fost evaluată prin monitorizarea concentrației de Tempol după adăugarea extractului de struguri și comparată cu cea a acidului galic (Fig V.5) [17, 58].

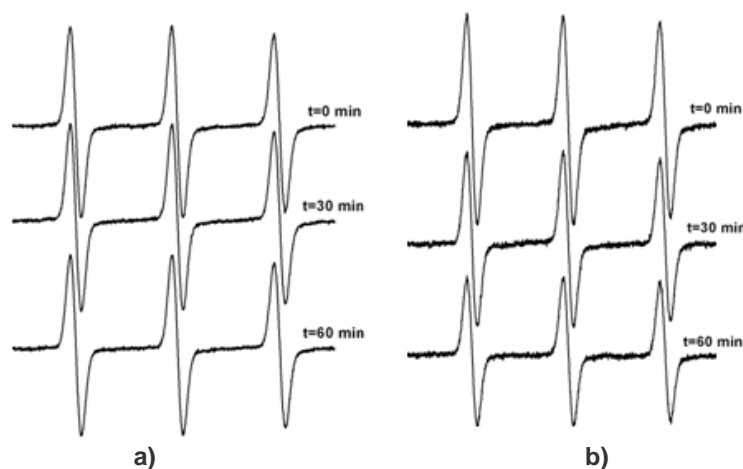


Fig. V.5 Spectrele RES ale tempolului după diferiți timpi de incubare în extract de BM (a) și acid galic (b)

Comparând activitatea antioxidantă a extractului cu cea a acidului galic, se constată că extractul de semințe de struguri are un caracter antioxidant mai slab. Rata de reacție dintre extract și Tempol s-a monitorizat utilizând dubla integrală normalizată a semnalului RES (Fig.V.6).

Cu scopul determinării și cuantificării efectelor extractului asupra pielii iradiate, a fost determinată activitatea unor enzime antioxidante prezente în

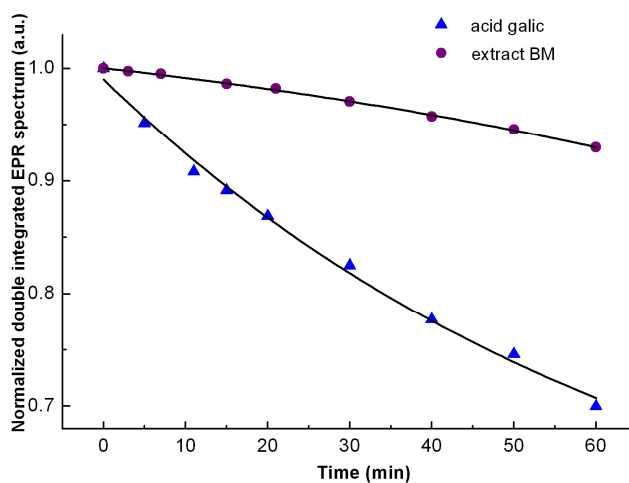


Fig. V.6 Dubla integrală normalizată a spectrelor RES pentru extractul BM și acid galic

piele precum: superoxid dismutază (SOD), catalază (CAT) și glutation peroxidază (GPx). De asemenea au fost determinate nivelurile de malondialdehidă (MDA), produsul final al procesului de peroxidare lipidică.

Pielea a mai fost examinată pentru depistarea celulelor arse la 24 ore după ultima expunere. Pe loturile în care s-a aplicat extract s-a evidențiat o scădere cu 40-50% a numărului de celule arse, fapt ce demonstrează efectul protectiv al extractului.

Rezultatele cumulate demonstrează că extractul de BM aplicat înaintea fiecărei iradieri poate inhiba degradările induse de expunerea repetată la radiații UVB, prin modularea mecanismelor de protecție antioxidantă.

Calluna Vulgaris

Au fost evaluate efectele fotochemoprotective ale extractului de *Calluna Vulgaris* asupra pielii șoarecilor albișori SKH-11 după expunerea la doze multiple de radiații UVB, metodologia fiind cea utilizată în cazul extractului de semințe de struguri. Activitatea antioxidantă a extractului s-a evaluat prin spectroscopie RES utilizând radicalul nitroxidic Tempol [58]; s-a urmărit concentrația radicalului după adăugirea de extract de CV și acid galic (Fig.V.7).

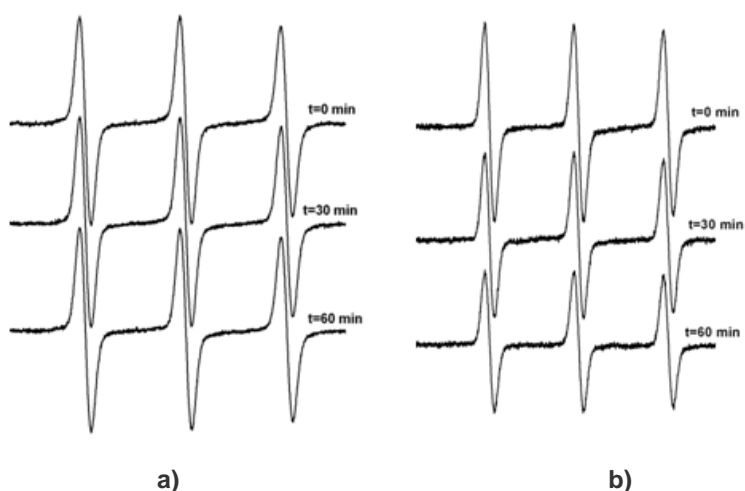


Fig. V.7 Spectrele RES ale tempolului după diferiți timpi de incubare în extract de CV (a) și acid galic (b)

Rata de reacție dintre extract și Tempol s-a monitorizat utilizând dubla integrală normalizată a semnalului RES (Fig. V.8). După cum se observă în figura V.7, extractul are o activitate antioxidantă mai slabă decât cea a acidului galic, rezultat obținut și în cazul extractului de BM.

S-a constatat că pretratarea cu extract a determinat o scădere ușoară a numărului de celule arse, efect evidențiat și în cazul utilizării extractului de BM.

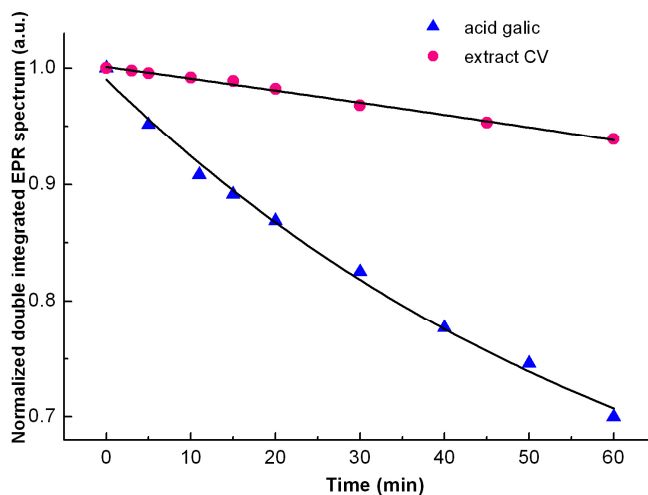


Fig. V.8 Dubla integrală normalizată a spectrelor RES pentru extractul de Calluna Vulgaris și acidul galic

Rezultatele asupra ambelor extracte, sugerează faptul că aplicarea topică a extractelor de BM sau CV, suprimă considerabil deteriorările induse de expunerea multiplă la radiații UV-B, prin inhibarea vătărilor ADN și apoptozei. Se constată, de asemenea, că extractul de BM are un caracter antioxidant ușor mai puternic decât cel de CV (Fig. V.9), de aceea este de așteptat ca BM să fie mai eficient în blocarea reacțiilor în lanț produse de ROS în pielea expusă la radiații UVB [59]

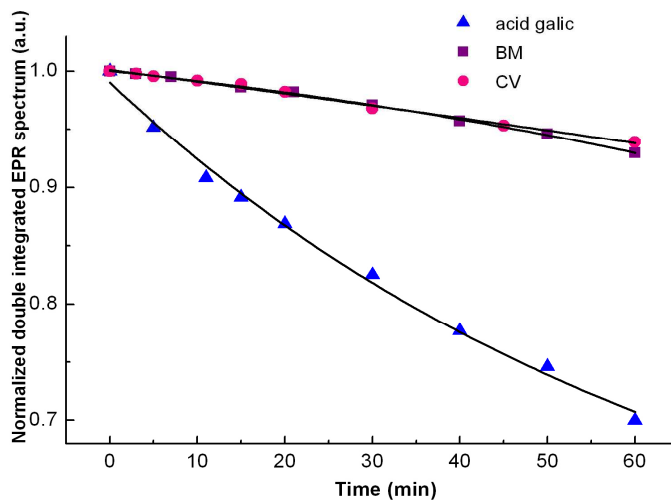


Fig. V.9 Dubla integrală normalizată a spectrelor RES pentru acidul galic și extractele de BM și CV

Concluzii

- Spectroscopia RES este o tehnică foarte sensibilă de **detectie directă** sau **indirectă** a radicalilor liberi prezenți în sisteme biologice sau farmaceutice.
- Măsurătorile RES directe efectuate asupra pulberilor de *Purinethol* și *Clorhidrat de Metformin* iradiate cu radiații gama demonstrează prezența mai multor specii paramagnetice stabile, a căror concentrații relative depind de doza absorbită.
- Dependența liniară a intensității semnalului RES în funcție de doza absorbită, demonstrează că metforminul poate fi utilizat ca indicator biodozimetric.
- Măsurătorile RES asupra unor *rășini compozite fotopolimerice* au arătat formarea și persistența unor radicali polimerici ai derivaților metacrilici, a căror concentrație este dependentă atât de sistemul inițiator cât și de amestecul de monomeri utilizați în obținerea rășinilor compozite.
- Radicalii hidroxil generați în *reacția Fenton* au fost detectați și caracterizați prin spectroscopie RES de joasă și înaltă frecvență (bandă X și bandă W), utilizând capcana de spin PBN (N-terț-butil- α -fenilnitronă).
- Pentru sistemul *xantin-xantin oxidază* speciile reactive ale oxigenului (în special superoxid și peroxid de hidrogen) au fost detectate utilizând trei tipuri de capcane de spin: DMPO (5,5-dimetil-1-pirolin-N-oxid), DEPMPO (5-dietoxifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oxid) și DIPPMPPO(5-diizopropoxifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oxid). S-a urmărit determinarea condițiilor optime de detectie a radicalului superoxid, prin spectroscopie RES de joasă și înaltă frecvență (banda X și W).
- *Superoxidul de potasiu* dizolvat în dimetil sulfoxid (DMSO) a fost utilizat ca sistem generator de radicali hidroperoxid HOO^\cdot și hidroxil HO^\cdot . S-a urmărit detectarea și caracterizarea radicalilor generați de superoxidul de potasiu în soluție alcalină folosind capcana de spin DEPMPO. S-a constatat faptul că stabilitatea spin aducțiilor este puternic dependentă de raportul dintre cantitatea de superoxid de potasiu din soluție și cantitatea de capcană de spin utilizată.
- Utilizarea radicalilor nitroxidici stabili și a spectroscopiei RES este o metodă foarte sensibilă pentru evaluarea calitativă a capacității antioxidante a extractelor naturale. Au fost astfel caracterizate câteva sucuri naturale (*sucuri de mere și struguri*) și extracte de plante utilizate în dermatologie (*semințe de struguri* și *Calluna Vulgaris*). S-a constatat că ambele extracte aplicate pe pielea șoarecilor expusă la radiații UVB, au rol fotochemoprotectiv, fiind eficiente în blocarea reacțiilor în lanț produse de speciile reactive ale oxigenului în piele.

Bibliografie

1. R. Olinescu, *Radicali liberi în fiziopatologia umană*, Ed. Tehnică, București (1994)
2. I. Fridovich, *The biology of oxygen radicals*, Science 201: 875–880 (1978)
3. B. Chance, H. Sies and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*, Physiol Rev 59: 527–605 (1979)
4. W. Dröge, *Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function*, Physiol Rev 82: 47–95 (2002)
5. M. Brustolon and E. Giamello, *Electron Paramagnetic Resonance: A Practitioner's Toolkit*, John Wiley & Sons, Inc., (2009)
6. J.E. Wertz & J.R. Bolton, *Electron Spin Resonance - Elementary theory and practical applications*, McGraw-Hill, Inc, USA, (1972)
7. M. Suhaj, J. Rácová, M. Polovka, V. Brezová, *Effect of gamma-irradiation on antioxidant activity of black pepper (Piper nigrum L.)*, Food Chemistry, 97:696-704 (2006)
8. S. Çolak, *ESR identification of gamma-irradiated albendazole*, Radiation Effects and Defects in Solids, 165(1):72:82 (2010)
9. S. Çolak & M. Korkmaz, *ESR response of gamma-irradiated sulfamethazine*, Radiation Effects and Defects in Solids, 164(12): 788-799 (2009)
10. G. Damian, *EPR investigation of γ -irradiated anti-emetic drugs*, Talanta, 60: 923-927 (2003)
11. G. Damian & V. Miclăuș, *Radicali nitroxidici*, Editura Fundației pentru Studii Europene, Cluj-Napoca, (2001)
12. E.G. Janzen & B.J. Blackburn, *Detection and identification of short-lived free radicals by an electron spin resonance trapping technique*, Journal of the American Chemical Society, 90(21): 5909-5910 (1968)
13. O. Ouari, M. Hardy, H. Karoui and P. Tordo, *Recent developments and applications of the coupled EPR/Spin trapping technique (EPR/ST)*, Electron Paramag. Reson., 22:1–40 (2011)
14. H.M. Swartz & L. Berliner, *Introduction to in vivo EPR*. In: Biological Magnetic Resonance - Volume 18: In Vivo EPR (ESR): Theory and Applications, Berliner LJ (ed.), Plenum Publishers, New York, 1-21 (2003)
15. L. J. Berliner, V. Khramtsov, H. Fujii, T. L. Clanton, *Unique in vivo applications of spin traps*, Free Radical Biology and Medicine, 30(5): 489– 499 (2001)
16. D. Marsh, *ESR spin label studies of lipid-protein interactions*, in Watts A& De Pont JJHMM (Editors), progress in Protein-Lipid Interactions, Elsevier, Amsterdam (1985)
17. V.N. Kocherginsky, H. Swartz, *Nitroxide Spin Labels: Reaction in Biology and Chemistry*, CRC Press, Boca Raton (2011)

18. D.A. Măgdaş, N.S. Vedeau, **L. Bolojan**, R. Puşcaş, G. Damian, *Comparative study between single strength juices and commercial natural juices by IRMS and EPR*, *Studia UBB Chemia*, 56, LVI(2):19-27 (2011)
19. B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. -3rd ed., Oxford, Oxford University Press (1999)
20. C. Frejaville, F. Karoui, F. Le Moigne, M. Culcasi, S. Pietri and P. Tordo, *Nouvelles nitrones utilisables pour le piégeage des radicaux libres*, France Patent FR2707990 (1995)
21. H. Karoui, N.Hogg, C. Fréjaville, P. Tordo and B. Kalyanamaran, *Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxyxynitrite*, *J. Biol. Chem.* 271: 6000-6009 (1996)
22. H. Karoui, A. Rockenbauer, S. Pietri and P. Tordo, *Spin trapping of superoxide in the presence of beta-cyclodextrins*, *Chem.Comm.*, 24:3030-3031(2002)
23. C. Frejaville, H.Karoui, B. Tuccio, F. Le Moigne, M. Culcasi, S. Pietri, R. Lauricella, P.Tordo, *5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-Oxide: a new efficient phosphorylated nitron for the in vitro and in vivo spin trapping of oxygen-centered radicals*, *J. Med. Chem.*, 38(2):258–265 (1995)
24. G.Bacić, I.Spasojevic, B. Secerov, M. Mojović, *Spin-trapping of oxygen free radicals in chemical and biological systems: New traps, radicals and possibilities*, *Spectrochimica Acta Part A*, 69(5):1354–1366 (2008)
25. K. Stolze, N. Udilova and H. Nohl, *Spin trapping of lipid radicals with DEPMPO-derived spin traps: detection of superoxide, alkyl and alkoxy radicals in aqueous and lipid phase*, *Free Radical Biology & Medicine*, 29(10):1005–1014 (2000)
26. M. Polovka, *EPR spectroscopy: A tool to characterize stability and antioxidant properties of foods*, *Journal of Food and Nutrition Research*, 45(1):1-11 (2006)
27. B. Halliwell, & J.M.C. Gutteridge. *Recording the EPR signal decay caused by the reaction with natural or artificial reductants or with product of metabolic reactions it is possible to draw conclusions about antioxidant capability*, Oxford University Press., First edition (1985), second edition (1989), third edition (1999)
28. M.A. Morsy, M.M. Khaled, *Novel EPR characterization of the antioxidant activity of tea leaves*, *Spectrochimica Acta A*, 58(6):1271-1277 (2002)
29. G.C. Yen, P.D. Duh, H.L. Tsai, *Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid*, *Food Chemistry*, 79(3):307-313 (2002)
30. H. Brutlach, E. Bordignon, L. Urban, J.P. Klare, H.J. Reyher, M. Engelhard, H.J. Steinhoff, *High-Field EPR and Site-Directed Spin Labeling Reveal a Periodical Polarity Profile: The Sequence 88 to 94 of the Phototransducer NpHtrII in Complex with Sensory Rhodopsin, NpSRII*, *Appl. Magn. Reson.* 30(3):359-372 (2006)
31. C. J.A. von Fraunhofer, P. Curtis Jr., *Physical and mechanical properties of anterior and posterior composite restorative materials*, *Dental Materials*, 5(6):365-368 (1989)

32. P. Magne, U.C. Belser, *Porcelain versus composite inlays/onlays: effects of mechanical loads on stress distribution, adhesion, and crown flexure*, International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry, 23(6):543-555 (2003)
33. S.G. Pereira, J.P. Telo, T.G. Nunes, *Towards a controlled photopolymerization of dental dimethacrylate monomers: EPR studies on effects of dilution, filler loading, storage and aging*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 19(9):3135-3144 (2008)
34. D. Prodan, L. Silaghi-Dumitrescu, C. Prejmean, R. Silaghi-Dumitrescu, **L. Bolojan**, G. Damian, *Evaluation of free radical concentration in some new dental composite materials by ESR Spectroscopy*, Studia UBB Chemia, 56, LVI(3):201-206 (2011)
35. G.P. Jacobs, P.A. Wills, *Recent Developments in the Radiation Sterilization of Pharmaceuticals*, Radiation Physics and Chemistry, 31(4-6):685-691 (1988)
36. M. Ikeya, *New Application of Electron Spin Resonance—Dating, Dosimetry and Microscopy*, Word Scientific, Singapore (1993)
37. M. Strlič, J. Kolar, B. Pihlar, *The Effect of Metal Ion, pH and Temperature on the Yield of Oxidising Species in a Fenton-like System Determined by Aromatic Hydroxylation*, Acta Chim. Slov., 46(4):555-566 (1999)
38. J. Prousek, *Fenton Reaction after a Century*, Chem. Listy, 89(1):11-21, 1995
39. E.M. Siedlecka, P. Stepnowski, *Phenols degradation by Fenton reaction in the presence of chlorides and sulfates*, Polish J. Environ. Studies, 14(6):823-828 (2005)
40. L. Deguillaume, M. Leriche and N. Chaumerliac, *Impact of radical versus non-radical pathway in the fenton chemistry on the iron redox cycle in clouds*, Chemosphere, 60(5):718-724 (2005)
41. 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(1): 69-74 (1978)
42. E.G. Janzen & Y.K. Zhang, *Identification of Reactive Free Radicals with a New ³¹P-Labeled DMPO Spin Trap*, Journal of Organic Chemistry, 60(17): 5441-5445 (1995)
43. 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(6):1330-1338, (1996)
44. I.B. Afanas'ev, *Superoxide ion: chemistry and biological implication*, vol.2, CRC Press, Inc, Boca Raton, (1991)
45. P.S. Singh and D.H. Evans, *Study of the electrochemical reduction of dioxygen in acetonitrile in the presence of weak acids*, J. Phys. Chem. B, 110(1): 637-644 (2006)
46. M. Mojović, M. Vuletić, G. Bacić, *Detection of oxygen-centered radicals using EPR spin-trap DEPMPO: the effect of oxygen*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1048:471-475 (2005)
47. **L. Bolojan**, I. M. Takács, V. Miclăuș, G. Damian, *EPR spin trapping study of superoxide radicals from potassium superoxide*, Applied Magnetic Resonance, [DOI:10.1007/s00723-011-0310-9](https://doi.org/10.1007/s00723-011-0310-9)

48. R.S. SOHAL, R.J. MOCKETT & W.C. ORR, *Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis*, *Free Radic. Biol. Med.*, 33(5):575–586 (2002)
49. M.L. Andersen, H. Outtrup, L.H. Skibsted, *Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping*, *J. Agric. Food Chem.*, 48(8):3106–3111 (2000)
50. Suh, H. J., Lee, J. M., Cho, J. S., Kim, Y. S. et al., *Radical scavenging compounds in onion skin*, *J. Food Res. Int.*, 32(10):659–664 (1999)
51. M. Sentjurc, M. Nemeč, H.D. Connor, V. Abram, *Antioxidant activity of *Semperivum tectorum* and its compounds*, *J. Agric. Food Chem.*, 51(9):2766–2771 (2003)
52. B. A. Jurkiewicz, G.R. Buettner, *Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study*, *Photochem. Photobiol.*, 59(1):1–4 (1994)
53. R.M. Haywood, P. Wardman, D.T. Gault, C. Linge, *Ruby laser irradiation (694 nm) of human skin biopsies: assessment by electron spin resonance spectroscopy of free radical production and oxidative stress during laser depilation*, *Photochem. Photobiol.* 70(3):348–352 (1999)
54. S. Rohn and L. W. Kroh, *Electron spin resonance – A spectroscopic method for determining the antioxidative activity*, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49(10):898 – 907 (2005)
55. N.S. Vedeanu, D.A. Magdas, **L. Bolojan** and G. Damian, *Antioxidant potential and authenticity of some commercial fruit juices studied by EPR and IRMS*, *Chemical Papers*, [DOI:10.2478/s11696-011-0115-1](https://doi.org/10.2478/s11696-011-0115-1) (2011)
56. A. Filip, D. Daicoviciu, S. Clichici, T. Mocan, A. Muresan, I. D. Postescu, *Photoprotective effects of two natural products on ultraviolet B–induced oxidative stress and apoptosis in SKH-1 mouse skin*, *Journal of Medicinal Food*, 14(7-8):761–766 (2011)
57. A. Filip, D. Daicoviciu, S. Clichici, P. Bolfa, C. Catoi, I. Baldea, **L. Bolojan**, D. Olteanu, A. Muresan, I.D. Postescu, *The effects of grape seeds polyphenols on SKH-1 mice skin irradiated with multiple doses of UV-B*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology*, 105(2):133-142 (2011), [DOI:10.1016/j.jphotobiol.2011.08.002](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.08.002)
58. A. Hosu, C. Cimpoi, V. Miclaus, G. Damian, I. Tarsiche, N. Pop, *Influence of intermittent heating during maceration on the antioxidant capacity of some grape seeds and skins*, *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 38 (1) :41–43 (2010)
59. A. Filip, S. Clichici, D. Daicoviciu, C. Catoi, P. Bolfa, I.D. Postescu, A. Gal, I. Baldea, C. Gherman, A. Mureșan, *Chemopreventive effects of *Calluna Vulgaris* and *Vitis Vinifera* extracts on UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice*, *Journal of Physiology and Pharmacology*, 62(3):385-392 (2011)
60. **L. Bolojan**, I. Csillag, V. Miclaus, G. Damian, *Free radicals investigation in γ -irradiated Purinethol (6-MP)*, *Farmacia*, accepted