

**UNIVERSITATEA " POLITEHNICA" DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE CHIMIE INDUSTRIALĂ
ȘI INGINERIA MEDIULUI**

ING. OLARIU LUCIA ILEANA

TEZĂ DE DOCTORAT

**BIBLIOTECA CENTRALĂ
UNIVERSITATEA "POLITEHNICA"
TIMIȘOARA**

**Conducător științific
Prof. Dr.Ing. ALFA-XENIA LUPEA**

1999

**UNIVERSITATEA “ POLITEHNICA” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE CHIMIE INDUSTRIALĂ
ȘI INGINERIA MEDIULUI**

ING. OLARIU LUCIA ILEANA

**EXTRACT NATURAL DE ALLIUM SATIVUM CU
EFECTE TERAPEUTICE; SINTEZA ȘI
CARACTERIZAREA SULFOXIZILOR CISTEINEI,
COMPONENTI RĂSPUNZĂTORI AI ACESTOR
EFECTE**

624.494
181 Δ

**Conducător științific
Prof. Dr.Ing. ALFA-XENIA LUPEA**

1999

Mulțumesc în primul rând conducătorului științific pentru îndrumarea atentă acordată pe tot parcursul elaborării tezei precum și tuturor colegilor care m-au îndrumat și ajutat în interpretarea și finalizarea cercetărilor biochimice, microbiologice și histochimice din cadrul tezei.

Și nu în ultimul rând aduc mulțumiri fiului și soțului meu, care în toată aceasta perioadă au fost alături de mine, asigurându-mi aportul moral și material necesar.

CUPRINS

Introducere	1
PARTEA A-I A - STUDIU BIBLIOGRAFIC	5
Capitolul 1. Grupările tiolice și implicațiile lor în procesele metabolice	5
1.1 Reactivitatea grupărilor –SH.....	5
1.2 Chimia și biochimia grupărilor tiolice și disulfurice.....	5
1.3 Compuși cu structuri simple cu grupări –SH libere și punți disulfurice prezente în organismele vii.....	6
1.4 Compuși cu structuri complexe în interrelație cu grupări –SH libere și punți disulfurice prezente în organismele vii	14
Capitolul 2.	
2.1. Compoziția chimică al <i>Allium sativum</i>	18
2.2. Compușii răspunzători de aromă și proprietățile fiziologice ale speciei <i>Allium sativum</i>	25
2.2.1. Compușii răspunzători de aromă , în <i>Allium sativum</i>	25
2.2.2.Enzimele răspunzătoare de caracterul aromat din <i>Allium sativum</i>	28
2.2.3.Biosinteza precursorilor cu caracter aromatic	28
2.2.4. Biogeneza compușilor aromatizanți	31
2.2.5. Compușii volatili din <i>Allium sativum</i>	33
2.2.6. Evaluarea intensității aromei în speciile <i>Allium</i>	34
2.2.7.Factorii care afectează compoziția chimică a speciei <i>Allium</i>	35
2.3Enzima cheie- Allinaza	38
2.4. Allicina, principiul activ al <i>Allium sativum</i>	42
PARTEA A-II A- CONTRIBUȚII PERSONALE	
Capitolul 3.	
3.1 Obținerea extractelor de <i>Allium sativum</i>	50
3.1.1.Considerații teoretice cu privire la obținerea extractelor din plante	50
3.1.2.Obținerea extractelor de <i>Allium sativum</i> autohton	50
3.1.2.1. Obținerea extractelor de <i>Allium sativum</i> prin distilare uscată	50
3.1.2.2. Obținerea extractelor apoase de <i>Allium sativum</i>	51
Capitolul 4.	
Sinteza unor S-alchil L-cisteine și a sulfoxizilor lor corespunzători	67
4.1.Considerații teoretice	67
4.2.Sinteza S-alchil L-cisteinelor	69
Analiza elementală a S-alchil L-cisteinelor	73
Atribuirile spectrelor în IR și RMN ale S-alchil L-cisteinelor	74
4.3. Sinteza S-alchil L-cistein sulfoxizilor	77
Analiza elementală a S-alchil L-cistein sulfoxizilor.....	80
Atribuirile spectrelor în IR și RMN ale S-alchil L-cistein sulfoxizilor	81
Capitolul 5.	
Separarea și caracterizarea allinazei- enzima cheie din <i>Allium sativum</i>	86
5.1.Separarea enzimei allinaza prin cromatografie pe coloană	87
5.2. Determinarea masei moleculare a enzimei allinaza prin cromatografie de gel filtrare	92
5.3.Determinarea influenței substratului și a efectorilor asupra activității enzimice a allinazei	100
5.3.1.Considerații generale	100
5.3.2.Determinarea influenței unor efectori enzimatici asupra activității enzimatice a enzimei allinaza	106

Capitolul 6.

Teste biologice ale extractelor de <i>Allium sativum</i> și ale unor derivați de S-alchil-L-cisteină	122
6.1.Determinarea activității bactericide și bacteriostatice ale unor extracte de <i>Allium sativum</i> și derivați de S-alchil-L-cisteină.....	122
6.1.1.Material și metodă	123
6.1.2.Rezultate și discuții	126
6.1.3.Concluzii	129
6.2. Determinarea activității antifungice a extractului apos de <i>Allium sativum</i> .	130
6.2.1.Material și metodă	131
6.2.2.Rezultate și discuții	131
6.2.3.Concluzii	132
6.3.Decontaminarea aerului din incinte, prin operația de aerosolizare cu un extract de <i>Allium sativum</i>	134
6.3.1.Considerații teoretice	134
6.3.2.Material și metodă	135
6.3.3.Rezultate și discuții	137
6.3.4.Concluzii	138
6.4. Determinarea efectelor unor extracte de <i>Allium sativum</i> asupra unor parametri biochimici și asupra unor enzime la șobolani	140
6.4.1. Influența unui extract concentrat asupra unor enzime oxidoreducătoare(catalaza, methemoglobin reductaza, glutathion reductaza) și a unor parametri biochimici în strânsă corelație cu oxidoreductazele	142
6.4.1.1.Material și metodă	142
6.4.1.2.Rezultate și discuții	148
6.4.1.2.1. Influența unui extract concentrat de <i>Allium sativum</i> asupra activității catalazei sanguine	149
6.4.1.2.2. Influența unui extract concentrat de <i>Allium sativum</i> asupra activității methemoglobin reductazei	151
6.4.1.2.3. Influența unui extract concentrat de <i>Allium sativum</i> asupra activității glutathion reductazei	153
6.4.1.2.4. Influența unui extract concentrat de <i>Allium sativum</i> asupra proteinemiei	155
6.4.1.2.5. Influența unui extract concentrat de <i>Allium sativum</i> asupra hemoglobinemiei	156
6.4.1.2.6. Influența unui extract concentrat de <i>Allium sativum</i> asupra methemoglobinemiei	158
6.4.1.2.7. Influența unui extract concentrat de <i>Allium sativum</i> asupra sideremiei	160
6.4.1.2.8. Influența unui extract concentrat de <i>Allium sativum</i> asupra activității transaminazelor serice	163
6.4.2. Influența unui extract concentrat asupra unor enzime oxidoreducătoare(catalaza, methemoglobin reductaza, glutathion reductaza) și a unor parametri biochimici în strânsă corelație cu oxidoreductazele	167
6.4.2.1.Material și metodă	167
6.4.2.2.Rezultate și discuții	167
6.4.2.2.1. Influența unui extract diluat de <i>Allium sativum</i> asupra activității catalazei sanguine	167
6.4.2.2.2. Influența unui extract diluat de <i>Allium sativum</i> asupra activității methemoglobin reductazei	169

6.4.2.2.3. Influența unui extract diluat de <i>Allium sativum</i> asupra activității glutathion reductazei	171
6.4.2.2.4. Influența unui extract diluat de <i>Allium sativum</i> asupra proteinemiei	172
6.4.2.2.5. Influența unui extract diluat de <i>Allium sativum</i> asupra hemoglobinemiei	174
6.4.2.2.6. Influența unui extract diluat de <i>Allium sativum</i> asupra methemoglobinemiei	175
6.4.2.2.8. Influența unui extract diluat de <i>Allium sativum</i> asupra activității transaminazelor serice	177
6.4.2.3. Interpretarea statistică a datelor obținute	180
6.4.3. Modificările survenite la nivelul unor organe de șobolan sub influența extractului concentrat de <i>Allium sativum</i>	187
6.4.3.1. Material și metodă	188
6.4.3.2. Rezultate și discuții	190
6.4.3.3. Concluzii	192
6.4.4. Modificările survenite la nivelul formulei leucocitare la șobolani tratați cu extract concentrat de <i>Allium sativum</i>	194
6.4.4.1. Material și metodă	194
6.4.4.2. Rezultate și discuții	195
6.4.4.3. Concluzii	196
6.4.5. Influența extractelor concentrate și diluate de <i>Allium sativum</i> asupra nivelului colesterolemiei, lipidelor totale și a trigliceridelor serice la șobolani cu hipercolesterolemie provocată	198
6.4.5.1. Material și metodă	200
6.4.5.2. Rezultate și discuții	204
6.4.5.3. Concluzii	212
6.5. Determinarea proprietăților de imunomodulator al extractelor naturale de <i>Allium sativum</i>	214
6.5.1. Studiul efectului imunostimulator și antitoxic al extractului de <i>Allium sativum</i> , la suine	217
6.5.1.1. Material și metodă	217
6.5.1.2. Rezultate și discuții	220
6.5.1.3. Concluzii	230
6.5.2. Studiul efectului imunostimulator a extractului de <i>Allium sativum</i> , la bovine	231
6.5.2.1. Material și metodă	231
6.5.2.2. Rezultate și discuții	231
6.5.2.3. Concluzii	234
Concluzii generale	235
Bibliografie	246

INTRODUCERE

Caracteristica majoră a lumii contemporane, o constituie necesitatea stringentă de a găsi soluții noi în toate domeniile de activitate, printre care, producția de bunuri alimentare rămâne problema fundamentală.

Necesitatea găsirii unor soluții noi se datorează, pe de o parte stării de degradare avansată a mediului ambiant, în urma aplicării unor metode necorespunzătoare de exploatare a naturii și de dirijare a proceselor de producție agricolă, a neconcordanței diferitelor activități ale societății umane, precum și, pe de altă parte, a epuizării unor surse de energie și materii prime, care au stat la baza tehnologiilor intensiv aplicate, mai ales în ultima sută de ani.

Starea de degradare a mediului înconjurător atât prin alterarea calității biologice a diferitelor nivele structurale ale biosferei, așa cum rezultă din scăderea fertilității solurilor cultivate și slăbirea rezistenței la boli a plantelor, animalelor și a omului, cât și prin intoxicarea aerului, apei și alimentelor cu substanțe nocive de sinteză (pesticide, medicamente, stimulatori de creștere) sau cu produse reziduale rezultate din diferite activități industriale (metale grele, bioxid de sulf, fluor, produși radioactivi, etc...).

În fața statisticilor privind răspândirea crescândă, a bolilor de degenerescență și a riscului demonstrat al unor tehnologii orientate numai pe criteriul economic îngust al rentabilității pe termen scurt, gândirea despre lume a evoluat, fiind obligată la reexaminarea și reevaloarea diferitelor puncte de vedere.

După ce înnoirile științifice și tehnice, care au avut loc în ultimele două secole, au creat o bază importantă pentru ridicarea nivelului material al oamenilor, lumea contemporană se găsește confruntată cu o serie de probleme majore.

Cu o frecvență din ce în ce mai mare apar cărți privind poluarea, resursele energetice, soluții noi pentru micșorarea intensității consumului de materii prime epuizabile. Nu mai puțin cunoscute sunt preocupările legate de lupta împotriva bolilor cu mare răspândire, cum sînt cele ale aparatului respirator, bolile de degenerescență, bolile genetice, lupta împotriva invaziilor de dăunători și a bolilor criptogamice la plante, precum și lupta pentru combaterea foamei, pentru salvarea patrimoniului genetic al Terrei, reprezentat prin speciile vegetale și animale, din care multe sunt amenințate cu dispariția într-un timp relativ scurt.

Descoperirea posibilității de a mări producția cu îngrășăminte chimice, a obligat, împreună cu calculele economice și considerentele care au dus la practicarea monoculturii și a rotațiilor simple de tip grâu-porumb, la inventarea pesticidelor (fungicide, insecticide, ierbicide), compuși chimici, care au devenit însoțitorii zilnici ai omului și ai aerului pe care acesta îl respiră.

Medicamentele de sinteză, care ușurează adesea situația unor bolnavi, atrag, destul de frecvent, după ele, intoxicații secundare care necesită aplicarea unui nou tratament, ce se poate solda cu o nouă deplasare a simptomatologiei.

Tranchilizantele de sinteză, înlătură suferința psihică, dar o înlocuiește adesea cu o incapacitate de a face față obligațiilor sociale, asigurând, nu seninătatea, ci o rupere de realitate prin starea de indiferență creată.

În sfîrșit, eradicarea unor boli este însoțită de extinderea altora, cum sunt în prezent bolile cardiovasculare, cancerul, diabetul, sindromul SIDA, etc... .

Medicația de sinteză are succese rapide în bolile acute și pornind de la această certitudine, în ultimul secol s-a dezvoltat o industrie puternică. Dar cu toate efectele

benefice, în ultimul secol, multe din aceste medicamente au, datorită utilizării lor excesive și de multe ori necontrolate, efecte nocive.

Câteva statistici ne redau următoarele rezultate: în S.U.A. mai mult de 100 de fabrici produc în jur de 3700 kg amfetamine pe an, adică 37 miliarde de doze. În Franța consumul de antibiotice constituie o treime din consumul total de medicamente, iar în S.U.A. între 1948-1966 s-au lansat pe piață 7563 de variante de noi medicamente (100).

Modificările ce apar la nivelul organismelor animale în urma acțiunii diferiților factori de stress și a procesului natural al îmbătrânirii, au fost studiate de foarte mulți cercetători. Până în prezent s-au concluzionat următoarele (97):

Modificările metabolismului glucidic legate de stări de stress și vârstă

Caracteristică principală: scăderea utilizării tisulare a glucozei

Dependentă de :

- modificări tisulare primare
 - scăderea numărului de celule active și a consumului lor de glucoză în scop energetic sau de sinteză
 - scăderea echipamentului enzimatic tisular (scăderea conținutului de coenzime ale metabolismului oxidativ, enzime oxidante și decarboxilante ale ciclului Krebs, etc.)
- modificări în eficiența mecanismelor de glicoreglare
 - deficiența răspunsului insulinic precoce (cu ~ 50 % față de organismul tânăr)
 - scăderea eficienței biologice a insulinei circulante

Se manifestă prin :

- scăderea ritmului de reînnoire a glucozei extracelulare
- diminuarea aportului de glucoză spre țesuturi
- scăderea toleranței la glucoză

Ipoteză:

Scăderea utilizării glucozei este în concordanță cu reducerea generală a activității biologice caracteristică îmbătrânirii, fiind concomitentă cu diminuarea consumului energetic și a ingestiei de alimente, cu modificarea metabolismului bazal, a capacității vitale și a debitului cardiac

Modificările metabolismului lipidic legate de stări de stress și de vârstă

Caracteristică: scăderea ritmului metabolismului lipidic

Dependentă de:

- alterări ale absorbției intestinale a grăsimilor neutre prin deficiența lipazei pancreatice
- anomalii de transport plasmatic al lipidelor:(prin apariția anomaliilor suportului proteic și ale hidrolizei plasmatice)
- scăderea catabolismului lipidic, datorat:
 - metabolismului insuficient al glucozei, producerea insuficientă de NADPH₂ (prin ciclul pentozo-fosfaților) și de α- glicerofosfat
 - modificărilor proprii ale țesutului adipos (citologice și de vascularizație)
 - modificărilor factorilor de reglare hormonală, a echilibrului enzimatic și vitaminic

Se manifestă prin :

- creșterea cantității de grăsime a organismului
- scăderea metabolismului țesutului gras (se manifestă prin scăderea reactivității la agenți catabolici- comparabilă cu cea întâlnită în ateroscleroză sau în cazul organismelor supuse unor stressuri repetate : în aceste situații peretele aortic se comportă similar cu țesutul adipos)
- hiperchilomicronemie

- creșterea nivelului majorității fracțiunilor lipidice
- alterarea curbei dinamice de încărcare lipidică

Ipoteză:

Poate fi o verigă a lanțului de fenomene metabolice, ce conduc la infiltrația grasă a peretelui aortic în senescență și ateroscleroză(97).

Modificările metabolismului proteic legate de stări de stress și vârstă

Caracteristici : creșterea metabolismului proteic (controversat)

Argumente :

- menținerea nealterată a proteinemiei totale și a unei varietăți de activități enzimatică sau hormonale
- formarea și creșterea activității unor enzime adaptative (ex.: triptofanperoxidaza sau tirozintransaminaza după administrare de cortizon)
- posibilitatea echilibrării bilanțului azotat , prin instituirea unei diete proteice corecte sau prin tratament cu steroizi anabolici

Parametrii biochimici modificați :

- hipoalbuminemie
- hiperglobulinemie (ca o ripostă a organismului față de scăderea albuminelor)
- modificări ale conținutului de aminoacizi liberi
- creșterea glutatationului oxidat
- valori maxime ale ureei
- hiperuricemie moderată
- hipercreatinemie discretă

Ipoteza: Reducerea permeabilității capilarelor față de moleculele proteice , tulburări de transport transcapilar, ce provoacă tulburări de difuziune , de ultrafiltrare și de transport activ(97).

Aceste modificări se resimt la nivele diferite ale țesuturilor.

Modificări la nivelul țesutului nervos

Cel mai afectat țesut , la care se pot observa primele alterări este țesutul nervos, datorită faptului că acesta este cel mai activ și sensibil la stresul zilnic precum și pentru că în activitatea acestuia sunt implicate o serie de enzime, cum ar fi cele implicate în procesele majore.

- Astfel legat de metabolismul glucidic , creierul utilizează cu preponderență glucoza liberă (la organismele afectate de stres și de procesul de îmbătrânire se constată o scădere a activității hexokinazei, mult mai intensă la organismele tinere). Pe de altă parte se constată , de asemenea , o scădere a activității enzimelor respiratorii din creier, cum ar fi : succinoxidaza, citocromoxidaza, succindehidrogenaza. Această scădere este diminuată nu printr-un fenomen de inhibare a activității ci printr-un mecanism de diminuare a sintezei proprii a enzimei, prin reducerea cantității de substanță din mitocondria substanței cenușii

În ceea ce privește o dereglare a metabolismului proteic , aceasta conduce la :

- acumulări de acid piruvic ceea ce provoacă dereglări neurologice , cu forme spastice și paralitice, în special la organismele în vârstă
- acumularea amoniacului (substanță toxică pentru organism) , care se produce datorită diminuării activității glutaminazei ATP-dependente, conduce la alterări la nivelul sistemului nervos central (SNC); activitatea enzimei (care este o enzimă cu grupări –SH) se poate restabili cu ajutorul substanțelor cu grupări –SH

Prin dereglarea metabolismului lipidic , foarte afectat este SNC. Are loc :

- o scădere a activității lipazelor și lecitinazelor conduce la procesul de demielinizare la nivelul celulei nervoase (în cazul persoanelor vârstnice).

O scădere cu 50% a activității acetilcolinesterazei, la nivelul medulosuprarenalei, conduce la o diminuare a conducerii influxului nervos și a generării potențialului electric în axoni, aceștia fiind responsabili de biocurenții din celula nervoasă, ceea ce va avea ca efect declanșarea unui întreg ansamblu de neurotulburări, consecutive fenomenului de îmbătrânire a celulei nervoase, răspunsul celulei nervoase, la noi stimuli, efectuându-se mult mai lent.

S-a constatat că o serie de modificări se datorează implicării grupărilor tiolice (-SH). Acestea sunt implicate într-o multitudine de procese esențiale pentru menținerea integrității funcției celulare cât și a fenomenelor de transfer membranar a diferitelor substanțe considerate de bază în metabolismul celular.

În cursul a numeroase cercetări s-a urmărit diminuarea acestor efecte, care în final duc la moartea organismelor; s-a recurs, în majoritatea cazurilor, la tratamentul medicamentos cu medicamente de sinteză, dar care pe lângă efectele benefice au și o serie de reacții nedorite.

În aceste condiții, în care scăderea imunității organismelor vii devine îngrijorătoare, intervine utilizarea unei terapii naturiste în scop profilactic. Tehnicile terapiei naturale s-au îmbogățit, tocmai în acest sens, simțitor în toată lumea; s-au acumulat date importante de cercetare fundamentală.

În cele mai multe țări activitatea curativă sanitară se face predominant cu medicație alopată. Bolnavii recurg la terapia naturistă doar când nu tolerează medicația clasică sau când aceasta nu a avut efect (boli grave, incurabile) ceea ce constituie încă o piedică în afirmarea posibilităților terapiei naturale.

Este necesară o îmbinare a celor două metode (alopată și naturistă) în așa fel încât suferința umană să fie diminuată la minim, spre binele bolnavului.

Orientarea actuală spre care se tinde în lume este instruirea multiterapeutică într-un domeniu de patologie; astfel terapeutul va aplica metoda care se pretează cel mai bine formei de boală sau tipului de bolnav care îi cere ajutorul.

Una dintre plantele cunoscute, încă din evul mediu, atât pentru proprietățile aromatizante cât și pentru proprietățile curative este usturoiul (*Allium sativum*).

În prezent această plantă este studiată pentru multitudinea de efecte benefice asupra organismelor vii cât și a analizării multitudinii principiilor active, existente în această plantă(21).

Prezenta teză este structurată pe 6 capitole și 262 de pagini, conține 333 de referințe bibliografice, 18 figuri, 68 de tabele, 47 de grafice și a condus la publicarea a 11 lucrări științifice și comunicarea a 2 lucrări.

PARTEA I-A

CERCETĂRI BIBLIOGRAFICE

CAPITOLUL 1

1. Grupările tiolice și implicațiile lor în procesele metabolice

1.1. Reactivitatea grupărilor -SH

Datorită acumulării unor cunoștințe deosebit de importante în ceea ce privește rolul grupărilor tiolice în organism, un mare număr de oameni de știință se preocupă în prezent de studiul efectelor acestor grupări, în special în procesele de îmbătrânire (145).

Acest interes deosebit este explicabil datorită importanței implicării grupărilor tiolice în funcția aparatului mitotic, în diviziunea celulară, în procesul de cariochineză, în structura tridimensională a moleculei proteice, în stimularea morfogenezei și a procesului de creștere, în polimerizarea AND-ului și în sinteza de ARN precum și în reglarea activității a numeroase enzime.

Grupările tiolice exercită un stimul și asupra mecanismului de reglare a respirației, participând la transferul de hidrogen de pe flavoproteină, la activarea citocrom - reductazei și facilitarea reducerii citocromului c de către NADH.

Importanța grupărilor -SH în procesele metabolice intermediare este oglindită și de rolul CoA-SH, care participă la metabolismul acizilor grași, la cel al glucidelor în cadrul ciclului Krebs precum și în metabolismul proteic.

Datorită reactivității mari a grupărilor -SH, acestea au fost denumite ca cele mai reactive grupări funcționale din rândul celor cunoscute în organismul viu.

1.2. Chimia și biochimia grupărilor tiolice și disulfurice

1.2.1 Structura și reacțiile grupărilor -SH

Grupările tiolice i-au parte la majoritatea proceselor metabolice importante din care cauză, modificările în structura și activitatea substanțelor ce conțin grupări tiolice se vor extinde asupra întregului organism.

Legătura covalentă dintre atomii de S și H determină între ei o densitate electronică mare, deși distanța dintre aceștia este mai mare decât cea a altor legături covalente (2.54 \AA față de 2.16 \AA , în cazul -OH).

Gruparea tiol este un acid slab, care disociază la un pH ridicat. Substanțele tiolice care conțin în molecula lor și grupări aminice dau naștere unui număr mare de ioni, determinând chiar un anumit gen de ciclizare, dependent de pH.

În cazul macromoleculor disociația electrolitică este puțin diferită și anume, relația dintre valoarea pH-ului din mediu și cea de pe suprafața miceliului influențează gradul de disociație a macromoleculor și reactivitatea grupărilor -SH.

Disociația cu un efect global electropozitiv (micele cationice) activează centri enzimatici activi, iar cea cu un efect global electronegativ (micele anionice) este ușor inhibitoare.

Reactivitatea și varietatea reacțiilor chimice, proprii grupărilor -SH, le conferă o importanță biologică dintre cele mai mari.

Proprietățile compușilor -SH cu molecule mici nu se pot transpune direct la compușii -SH macromoleculari de tip proteic, pentru că reactivitatea grupărilor -SH din macromolecule depinde și de natura chimică a aminoacizilor învecinați cu gruparea -SH, de structura complexă a macromoleculei, de configurația ei spațială, de caracterul polar sau nepolar al reactivilor, etc.

1.3. Compuși cu structuri simple cu grupări -SH libere și punți disulfurice prezente în organismele vii

Din clasa compușilor cu grupări tiolice și disulfurice fac parte substanțe foarte diverse ca: acizi organici, tioaminoacizi, oligopeptide etc. (145).

1.3.1. Cisteina și cistina

Acești aminoacizi au un metabolism comun: Echilibrul lor reprezintă una dintre cele mai importante reacții care ilustrează dinamismul substanței vii.

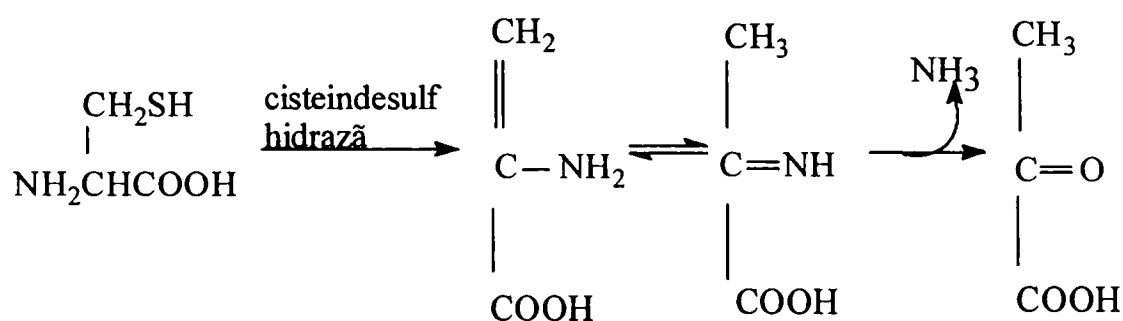
Reacția se produce sub acțiunea unor enzime specifice din clasa oxido-reductazelor (C.E.1), la al căror sistem participă citocromii și citocrom-oxidaza.

Biosinteza cisteinei are loc în organism la nivelul hepatocitului prin participarea metioninei, serinei, homocisteinei și cistationinei.

La animalele superioare, tinere și adulte, reacțiile de formare a cisteinei sunt reversibile.

Degradarea cisteinei se realizează pe multiple căi, care dovedesc caracterul glucogenic al acestui aminoacid.

Mecanismele de desulfurare a cisteinei au loc la nivelul ficatului și conduc la formarea acidului piruvic:



Desulfhidrarea cistinei sub acțiunea cisteindesulfhidrazei duce la formarea finală a acidului piruvic, și respectiv de ioni sulfat.

Formarea ionilor SO_4^{2-} din atomul de sulf al cisteinei se poate realiza după schema:

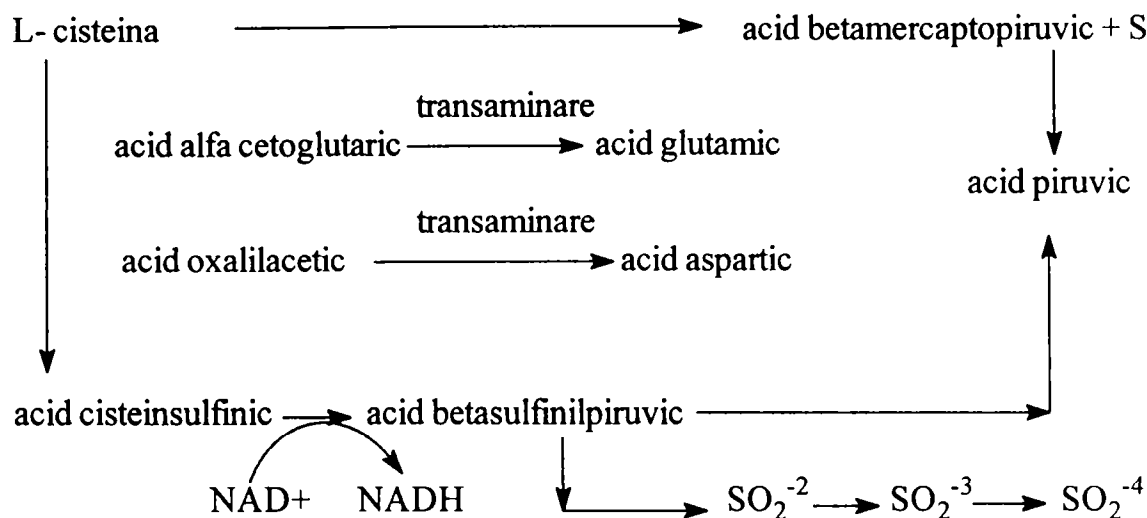


Fig. 1 Formarea ionilor SO₄²⁻ din atomul de sulf al cisteinei

(schemă preluată după Jocelyn (145))

La nivelul ficatului ionul de S²⁻ este transformat în ioni de tiosulfat, care apoi se oxidează la SO₄²⁻.

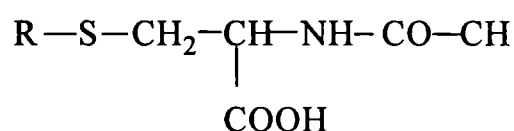
Oxidarea cisteinei la acid cisteinsulfenic (acid β-sulfinil- L -aminopropionic) inițiază transaminarea, decarboxilarea și oxidarea respectiv formarea acidului glutamic, a acidului piruvic și a taurinei.

Sulfatii, termenii finali ai compușilor organici cu sulf, se elimină sub diferite forme prin urină: sulfatii anorganici, esteri sulfurici sau sulfoconjugați.

Pentru a realiza aceste reacții, sulfatii trebuie să fie în prealabil activați prin intermediul ATP . În urma transformării lor în adenzin-3'-fosfat-5'-fosfosulfat devin activi.

Radicalul sulfat poate fi transferat pe diverși acceptori, prin intermediul transulfatazilor.

În afară de adenzin-3'-fosfat-5'-fosfosulfat, în procesele de detoxifiere intervine N-acetilcisteina, care formează acizi mercapturici prin cuplarea cisteinei cu compuși aromatici. Se obțin compuși netoxici de forma:



O economie importantă a organismului privind turnoverul cisteinei o constituie sinteza formil-cisteinei.

Cisteina intră în constituția unui tripeptid foarte important în procesele de oxido-reducere, constituit din cisteină, glicocol și acid glutamic: glutationul.

Proprietatea cisteinei de a fi oxidată la cistină se transmite și glutationului, în compoziția căruia se găsește, trecându-l astfel în glutation oxidat: 2G-SH → G-S-S-G.

Animalele își procură în general cisteina din dieta normală, prin digestie directă. Transferul cisteinei, împreună cu alți aminoacizi liberi, prin peretele intestinal în circuitul sanguin, se produce prin difuziune combinată cu transport activ.

Sistemele acestea pot fi congenital defectuoase.

Apariția cisteinei și a cistinei în cantități mari în urină se datorește unei devieri metabolice ereditare de la căile normale de eliminare, stabilind sindromul de

cistinurie. Acesta este caracterizat prin micșorarea valorii aminoacidului din sânge, deoarece prezența în urină de datorește unei reabsorbții tubulare defectuoase. Solubilitatea redusă a cisteinei duce la formarea de cristale, sub formă de calculi.

Cistinuria, afecțiune cu caracter ereditar, nu este corelată cu o dereglare a metabolismului cisteinei, cum ar fi cistinoza, maladie caracterizată prin creșterea concentrației de cistină și depozitarea ei sub formă de cristale la nivelul sistemului reticulo-endotelial (splină, ficat, rinichi, ochi).

1.3.2. Metionina

Metionina (acid α -amino- γ -metiltiobutiric) a fost izolată pentru prima oară din produsele de hidroliză acidă a lânii, ovalbuminei și cazeinei, iar ulterior, a fost izolată din majoritatea proteinelor animale și vegetale.

Ea este un aminoacid semiesențial pentru creșterea animalelor, jucând un rol însemnat în reacțiile de trasmetilare.

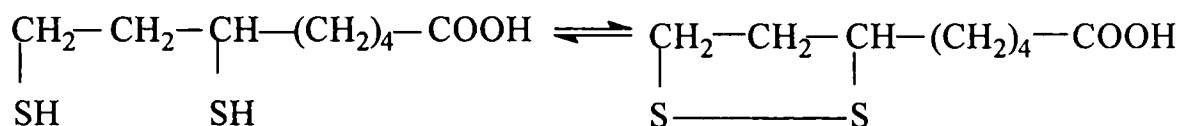
În prezența urmelor de apă oxigenată, metionina se oxidează ușor la sulfoxidul corespunzător iar o oxidare energetică duce la formarea de acid homocisteinsulfonic.

Dacă se administrează metionină marcată cu ^{14}C sau cu deuteriu la gruparea metil, ea se regăsește marcată în colină, adrenalina sau creatinina.

Un interes deosebit prezintă observația după care metionina sub formă de N-formilmetionil-ARNt sau de metionil-ARNt stă la baza sintezei proteice(332).

1.3.3. Acidul lipoic

Factor de creștere pentru numeroase microorganisme, acidul lipoic deține un rol deosebit și în metabolismul animal:

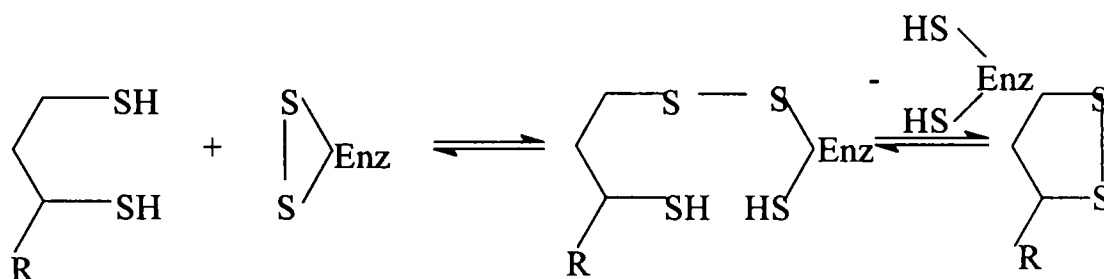


forma redusă

forma oxidată

Rolul său de coenzimă în sistemul multienzimatic este foarte important, deoarece catalizează decarboxilarea oxidativă a piruvatului și a α -cetoglutaratului pentru formarea de acetyl-CoA, respectiv succinil-CoA. Prin această funcție se leagă CoA și NAD^+ de decarboxilarea oxidativă a α -cetoacizilor.

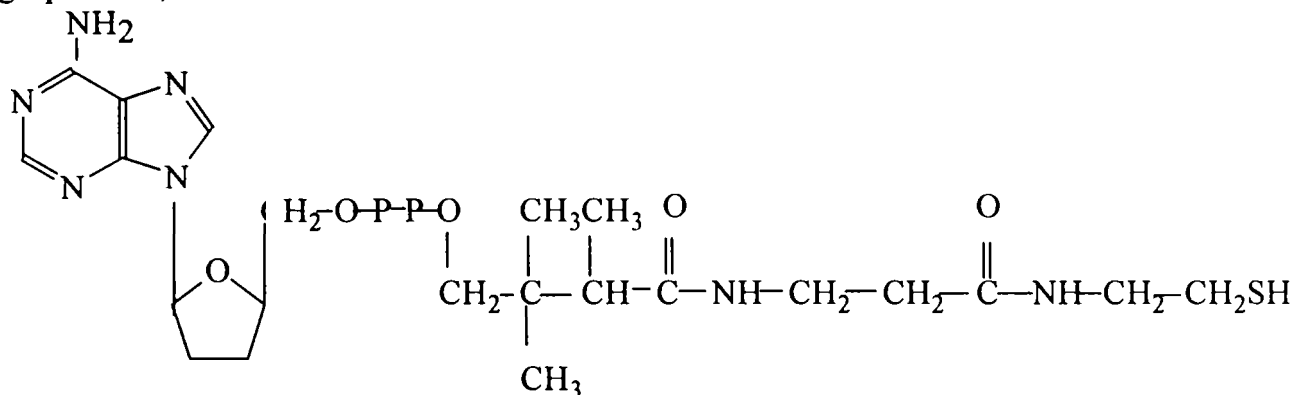
Interschimbul tiol-disulfură (lipoat-dihidrolipoat) cu grupările disulfurice ale proteinelor sau grupărilor tiol pare să stea la baza funcțiilor biologice ale acidului lipoic.



Astfel devine posibil ca acidul lipoic să stimuleze sau să inactiveze o enzimă sau un sistem enzimatic.

1.3.4. Coenzima A

Coenzima A joacă un rol important în transferul de grupări acil și în transportul de grupări tiol, cu care formează tioesteri:



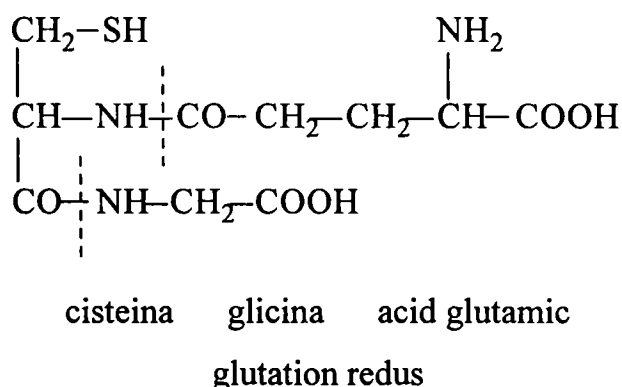
Acești compuși, bogați în energie, împreună cu compușii fosfați macroergici, contribuie la funcția transferului biologic de energie.

Cea mai mare parte a CoA din țesuturi se găsește sub formă de tioesteri, prin acilarea grupării sale -SH. Se cunosc forme libere cu gruparea -SH sau cu forma disulfurică.

Marea reactivitate a CoA S-acilată, observată în cursul studiilor cinetice, a dus la ipoteza că aceasta funcționează ca o coenzimă acetilantă. Reactivitatea coenzimei A S-acilată oglindește numărul mare și varietatea transformărilor în care ea este implicată, transformări care sunt fundamentale în metabolismul carbohidraților, în ciclul acizilor tricarboxilici, în metabolismul acizilor grași.

1.3.5. Glutacionul

Glutacionul este cel mai important tripeptid (γ -glutamil-cisteinil-glicina), universal răspândit, izolat inițial din drojdia de bere. Hopkins (331) a realizat cristalizarea compusului obținut și a stabilit structura sa de tripeptid:



Prezența cisteinei permite oxidarea glutacionului redus.

Proprietățile G-SH rezultă din caracterele celor trei aminoacizi.

În natură, glutacionul apare sub formă de multipli derivați biologic activi: S-metilglutacion (creier), homoglutacion (vegetale), acid oftalmic și acid noroftalmic (cristalin), S-acetilglutacion (creier, ficat), etc.

Datorită structurii sale chimice, glutationul se poate manifesta în diverse condiții ca acid, aminoacid, peptid, tiol, donator de grupări γ -glutamil.

Un rol determinant revine prezenței grupării -SH, de unde și procesele de oxidare, formarea de mercaptide, alchilarea, acilarea, reacțiile cu compuși carbonilici, desulfurarea.

G-SH se oxidează ușor la G-S-S-G, datorită potențialului său redox scăzut. Oxidarea poate fi realizată cu acid performic, iod, acid *o*-iodbenzoic, fericianură, diclorfenol-indofenol, peroxizi, oxigen și H₂O₂, în prezența Cu²⁺ drept catalizator etc.:



Oxidarea G-SH în prezența altor tioli duce la formarea unor disulfuri mixte. Reducerea G-S-S-G poate avea loc sub acțiunea hidrogenului în stare născândă (Zn + HCl), a H₂S sau a unor mercaptani în exces.

În general, nu se folosesc metodele catalitice, deoarece catalizatorii sunt otrăviți de ionul sulfură.

Ușurința cu care are loc interconversia formelor -SH și -S-S- în prezența unor preparate tisulare ar putea explica rolul pe care l-ar juca glutacionul în transportul celular de hidrogen și electroni.

Cercetările privind oxidarea enzimatică sunt îngreunate de existența în țesuturi a unor factori neenzimatici care pot interveni în acest proces (peroxizii, chinonele, unii compuși porfirinici cu fier). Un astfel de exemplu îl reprezintă reacția dintre G-SH și adenocrom.

Szent-Gyorgyi a observat pentru prima oară relația dintre acidul dehidroascorbic și G-SH; unele dintre preparatele tisulare reduc acidul dehidroascorbic, timp în care se produce oxidarea G-SH (331).

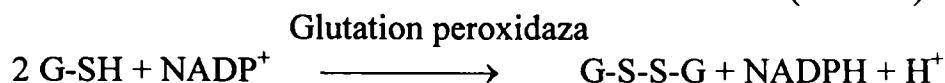
A fost pusă în evidență capacitatea hemolizatorilor eritrocitari și a preparatelor de ficat de a cataliza reacția dintre acidul dehidroascorbic și G-SH, pe cale neenzimatică. La plante, această reacție necesită prezența unei acid dehidroascorbic-reductaze. S-au pus în evidență și enzime care catalizează oxidarea G-SH *in vitro* (glutation-homocistein-transhidrogenaza, nitroglicerol-reductaza, citocrom-c-citocrom-oxidaza, catalaza). A fost identificată o nitroglicerol-reductază în ficat care catalizează oxidarea G-SH de către unele chimioterapice cardiovasculare, cum ar fi nitroglicerina; reacția decurge și neenzimatic.

Overall-ul reacției de sinteză a G-SH este controlat prin *feed-back*; inhibiția este controlată prin produsul obținut (G-SH), ca și de către enzima reglatoare, care intervine în etapa γ -glutamil-cisteinei. Enzima reglatoare este la rândul ei, inhibată de NADH. Cea de-a doua enzimă este inhibată de ATP.

Turnover-ul din celulele animale este foarte ridicat, mai ales în ficat, mai puțin în creier și eritrocite.

Funcția biologică a G-SH se explică prin funcția de sistem redox a glutacionului și trecerea sa reversibilă din forma sulfhidril în forma disulfurică.

Sistemul său celular de oxido-reducere poate fi reprezentat printr-o reacție biochimică, a cărei enzimă de oxidare este glutacion-peroxidaza, ce acționează în prezența coenzimei oxidate nicotinamid adenindinucleotid fosfat (NADP⁺):



Glutacionul este un constituent aproape universal al sistemelor biologice funcționale, absolut necesare dezvoltării și supraviețuirii celulei. Rolul său în

metabolismul celular este multiplu și complex, dar reacția sa metabolică cea mai importantă o constituie participarea la sistemul celular redox.

G-SH este ușor oxidat de oxigenul molecular. La nivelul celulei, reacția se datorează unor multiple sisteme enzimatică. Reacția inversă ($G-S-S-G \rightarrow G-SH$) este realizată sub acțiunea glutation-reductazei $NADP^+$ -dependentă. Activitatea glutation-reductazei variază în funcție de țesut și organ.

Proprietățile biologice ale G-SH țin de gruparea sa tiolică liberă, care îi conferă un caracter slab oxidant. Cuprul, fierul și alte metale stimulează procesul de oxidare, G-SH trecând reversibil în G-S-S-G.

Structura tiolică a G-SH explică multiplele sale intervenții ca substanță ce posedă grupări $-SH$ reactive, fiind considerat drept cel mai important tiol nonproteic. Dealtfel și concentrația sa în organism este mai mare decât a oricăreia dintre substanțele tiolice.

Una din căile de catabolism ale glutationului constă în desprinderea restului de acid glutamic și în hidroliza cisteinilglicinei la glicină și cisteină în prezența unei enzime ribozomale.

Hidroliza și transferul sunt catalizate de o singură enzimă, γ -glutamil-transpeptidaza, iar ciclizarea de o altă enzimă, γ -glutamil-ciclotransferaza. γ -glutamil-transpeptidaza face legătura membranei cu secvențele de reacții.

G-S-S-G pare să aibă căi diferite de degradare față de G-SH.

Determinările de glutation și marcarea glicinei cu ^{14}C au sugerat ideea unui schimb susținut de glutation între organe.

Păstrarea echilibrului $2G-SH \leftrightarrow G-S-S-G$ este deosebit de importantă pentru menținerea funcției biologice. O modificare a raportului G-SH/G-S-S-G în sens negativ influențează enzimele $-SH$, prin transformarea lor din Enz-SH (active) în enzime inactive. Relația G-SH/G-S-S-G influențează și determină sistemele redox și reglează schimburile intermediare .

Grupările $-SH$ prezintă importanță ca liant între enzimă, cofactor și substrat. Prin rolul lor steric, aceste grupări ar trebui să fie cât mai apropiate de locul de legătură ceea ce influențează efectul inductiv al legăturii enzimă-substrat sau enzimă-coenzimă-substrat.

Desfășurarea normală a procesului de biosinteză proteică reclamă o anumită concentrație celulară de G-SH.

Rolul G-SH/G-S-S-G în sinteza proteică reiese și din observația că proteinele fibrilare purtătoare de grupări $-SH$ sunt mai active decât cele cu grupări $-S-S-$. G-SH transferă hidrogenul său grupărilor $-S-S-$ de pe proteinele fibrilare, transformându-le în purtătoare de grupări $-SH$; micșorarea și apoi dispariția G-SH indică încheierea procesului de polimerizare.

Un alt fapt, extinderea formei globulare a proteinelor la cea liniară se face sub acțiunea G-SH , iar contracția fibrelor merge paralel cu modificările în concentrația grupărilor G-SH în timpul diviziunii celulare.

Acestor transportori de hidrogen le revine un rol important și în celulele animale. Astfel, în cristalinul normal, concentrațiile mari de G-SH și de acid ascorbic participă activ la procesele redox, necesare bunei funcționări a unor structuri avasculare; în procesele de devitalizare ale cristalinului, însoțite de dezvoltarea cataractei, scad valorile concentrațiilor de G-SH și de acid ascorbic și cresc cele de G-S-S-G.

Relația dintre grupările tiolice, mitoză și procesele de creștere a dus la teoria ciclului glutationului în cariokineză, ciclul glutationului constând în convertirea grupărilor disulfurice ($-S-S-$) intramoleculare, în grupări disulfurice intermoleculare.

În timpul formării aparatului mitotic (în pro-, meta- și telofază) crește concentrația glutationului total, variind în diferitele faze ale cariokinezei; în interfază, când în celulă au loc restructurări metabolice și pregătirea pentru diviziunea celulei, concentrația glutationului total scade.

- G-SH este protector al enzimelor tiolice. El intensifică acțiunea unor enzime proteolitice (pepsină, catepsină etc.), a celor din metabolismul hidrocarbonat (hexokinază, alcool-dehidrogenază etc.), a esterazelor, arginazei, anhidrazei carbonice etc.

- G-SH intră ca grupare prostetică în constituția unor enzime, cum ar fi în triozfosfat-dehidrogenaza, enzimă din ciclul anaerob al glucidelor.

Protejarea enzimelor tiolice de către glutation este asigurată prin reacțiile de formare a NADPH în cursul degradării oxidative a glucozei și reacția glutation-reductazică.

Enzimele cu grupări tiolice esențiale sunt inactivate când glutationul este oxidat, ceea ce duce la o diminuare în reducerea enzimatică a glutationului și la accentuarea leziunilor biochimice.

Dintre enzimele ce acționează în prezența glutationului putem aminti :

Unele **izomeraze** au drept coenzimă glutationul. Viteza de reacție, în prezența G-SH.

Glutation-reductaza a fost pusă în evidență în bacterii, drojdie, germeni de grâu și mazăre, eritrocite, trombocite și în serul sanguin la om. Această enzimă, alături de sistemele NADP⁺-reducătoare din țesuturi, este răspunzătoare de reducerea G-S-S-G și de menținerea glutationului tisular în stare redusă.

Reducerea G-S-S-G de către glutation-reductază în prezența NADPH poate fi realizată și de către H₂O₂ la pH slab alcalin.

Reducerea enzimatică a G-S-S-G poate fi cuplată cu orice sistem dehidrogenazic NADPH⁺-reducător, respectiv glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza (G-6-PDH), izo-citratdehidrogenaza și malic-enzima.

Glutation-peroxidaza. G-SH și acidul ascorbic pot fi oxidați pe calea sistemului citocrom-*c*-citocromoxidază. O serie de cercetători, studiind oxidarea cisteinei, a G-SH și a altor substanțe tiolice, în prezența citocrom-*c*-citocromoxidazei, au ajuns la concluzia că în țesuturile animale această enzimă nu ar reprezenta o cale majoră de transport a hidrogenului și a electronilor.

În eritrocit și în țesuturi a fost pusă în evidență peroxidaza care catalizează reacția de oxidare a G-SH cu H₂O₂ și protejează astfel celula de efectele dăunătoare ale H₂O₂ (258). A fost demonstrată prezența în eritrocitele umane a mecanismului de oxidare a G-SH, sub acțiunea glutation-peroxidazei (57).

Glutation-peroxidaza este activă numai în prezența unor cantități adecvate de G-SH, care servește ca donor de hidrogen.

Una din problemele puse în ultimul timp a fost aceea a elucidării mecanismului proceselor de detoxifiere a peroxizilor lipidici, în prezența G-SH drept cofactor și cu formarea unor acizi grași monohidroxiolenici metabolizabili.

Această reacție enzimatică rupe lanțul de reacții autocatalitice ale peroxidării lipidelor, protejând astfel compușii celulari vitali de acțiunea dăunătoare a peroxizilor lipidici (199,233).

Deosebit de interesantă apare o categorie specială de grupări tiolice, foarte active, întâlnite la unele oxido-reductaze. Este vorba de așa-numitele legături cu "sulf labil". Constituția lor este R-S-S-Me. Ele au fost decelate la dehidroorotat-dehidrogenază, succinat-dehidrogenază și xantinoxidază. În molecula enzimelor sunt cunoscute și legături cu sulf care nu sunt blocate de reactivi -SH decât după o reacție de reducere cu agenți adecvați. Acestea sunt legăturile -S-S-. Forma activă a moleculei este reprezentată de starea redusă, când se manifestă și sensibilitatea ei față de reactivii -SH (86).

Formele inactive ale enzimelor tiolice se pot datora și unor legături tiol-ester inferioare. S-a evidențiat că grupările tiol din constituția enzimelor prezintă o reactivitate mult mai mare decât cele din structurile micromoleculare, cum ar fi cele din cisteină, glutatation sau 2,3-dimercaptopropanol. Explicația fenomenului se datorește dispunerii grupărilor tiolice din enzime în centri activi, pe când grupările -SH ale moleculelor mici rămân cu reactivitatea lor normală, nemodificată. Centrul activ este reprezentat de o porțiune de moleculă special structurată, extinsă pe mai multe puncte active. Se cunosc enzime tiolice al căror centru activ este reprezentat de o singură grupare -SH, dar majoritatea au mai multe grupări active, adiacente acesteia. Gruparea "-SH înconjurată" se prezintă la un nivel superior de reactivitate față de gruparea "-SH"; de aici reiese rolul deosebit al grupărilor funcționale înconjurătoare care, prin caracterul polar sau nepolar sau prin proprietățile lor sterice, pot modifica sensibil accesibilitatea enzimei la substrat. Desigur, grupările -SH influențează și ele, la rândul lor, reactivitatea structurilor înconjurătoare.

În afară de categoriile de enzime tiolice ale căror grupări -SH afectează activitatea catalitică propriu-zisă, sunt cunoscuți și alți centri ai moleculei-enzimă, diferiți de centrul activi. Astfel, există grupări -SH constituențe ale centrului alosteric, caracteristic enzimelor reglatoare.

Dacă în centrul alosteric există o grupare -SH, acesta poate fi protejat de acțiunea razelor X prin tratarea prealabilă cu substanțe radioprotective. Aceste constatări au fost făcute pe molecule de fosforilază, reușindu-se să li se mențină funcția reglatoare și după iradiere, dacă grupările tiol au fost în prealabil protejate cu reactivi specifici. Sunt cazuri în care gruparea tiol din structura centrului activ, a centrului alosteric sau a celorlalți centri reactivi este indispensabilă activității, în condițiile unei anumite configurații a aminoacidului din lanțul polipeptidic. Dacă se înlocuiește, de exemplu, cisteina cu un alt tioaminoacid, activitatea enzimatică devine nulă. Astfel de exemplu este alcool-dehidrogenaza, la care cisteina a fost evidențiată prin marcarea cu iodacetat radioactiv. Studiile efectuate au demonstrat importanța integrării cisteinei în lanțul polipeptidic, ea constituind chiar locul de fixare a NAD⁺ (145).

Grupărilor -SH, care condiționează capacitatea funcțională a enzimelor, li se atribuie formarea compusului intermediar enzimă-substrat sau complexarea cu metale, care au tendința de a atrage electronii proveniți de la atomul de sulf. Prin aceasta, se produce o "relaxare" a electronilor vecini grupării tiolice, fenomen care activează reacția enzimatică.

Pomind de la diferențierea care apare între centrul activ și centrul alosteric se admite că funcția reglatoare a enzimelor ar fi chiar mai sensibilă decât funcția catalitică. Enzimele cu un centru alosteric -SH au o sensibilitate excesivă față de iradierea cu raze X.

În condiții biologice, cisteina și G-SH din celule constituie principalii factori de activare, după cum produșii lor de oxidare -G-S-S-G- și cistina - sunt factori de inactivare a enzimelor -SH active.

Proteinele enzimatică intracelulare sunt mai bogate în grupări tiolice decât cele extracelulare, datorită prezenței în celulă a cisteinei și a glutatationului în formă liberă. Proteinele "prenative", adică cele a căror structură terțiară este abia parțial formată, pot fi atacate mai ușor la nivelul grupărilor tiol.

1.4. Compuși cu structuri complexe în interrelație cu grupări -SH și punți disulfurice, prezente în organismele vii

1.4.1. Proteinele și acizii nucleici.

Coordonarea activității celulare în vederea menținerii unui raport echilibrat între procese de sinteză și degradare se realizează, esențial, prin controlul sintezei și activității protein-enzimelor. Acest control se poate realiza atât la nivelul sintezei de ARN-m (etapa de transcriere), cât și la nivelul etapelor citoplasmice de sinteză (etapa de translație).

Intervenția grupărilor -SH în reglarea expresiei genetice s-ar părea că se realizează prin intermediul histonelor bogate în arginină. Oxidarea grupărilor -SH ale acestor proteine nucleare, cu formarea de punți intermoleculare determină represiunea activității de *template* a ADN. Activitatea ARN-polimerazei depinde, de asemenea, de prezența unor compuși tiolici.

În reglarea sintezei proteinelor la nivel citoplasmatic, un rol important ar reveni compușilor celulari cu grupări tiol. Este știut că viața polizomilor este condiționată de acțiunea unei ribonucleaze specifice care degradează ARNm. A fost pus în evidență existența unui inhibitor al acestei enzime - o proteină cu grupări -SH, al cărui rol ar fi cel de stabilizare a polizomilor prin suprimarea degradării lor. S-a sugerat participarea ARN-azei și a inhibitorului său într-un mecanism de control, care ar regla sinteza proteică prin influențarea vitezei de degradare a ARNm.

Implicarea grupărilor -SH în reglarea sintezei proteice ar rezulta și din participarea acestora în procesele de asociere și disociere a ribozomilor. Ribozomii 70 S pot dimeriza, dând naștere la ribozomi 100 S, inactivi în sinteza proteică. Procesul depinde de integritatea grupărilor -SH din proteinele ribozomului 70 S. Este probabil ca numărul de grupări -SH al proteinei ribozomale să regleze raportul monomeri activi/dimeri inactivi în sinteza proteică.

1.4.1.1. Enzimele SH dependente din constituția proteinelor

Reglarea activității enzimelor este de mare importanță pentru celulă. Structurile apte de a recunoaște anumite semnale biochimice, reprezentate de anumiți metaboliți, și de a răspunde în consecință sunt proprii enzimelor dotate cu funcții specifice de reglare și control; în general, ele sunt proteine alosterice.

În ultima vreme (239) s-a conchis că grupările -SH ar deține un rol important în reglarea alosterică, prin prezența lor în centrul alosteric, legarea efectorului alosteric la unele enzime fiind condiționată de integritatea grupărilor -SH.

Prezența în țesuturi a numeroase sisteme enzimatică, capabile să reducă disulfurile mixte ale proteinelor cu compuși tiolici cu masă moleculară mică, face din mecanismul tiol-disulfură, un mecanism important de reglare celulară.

Intervenția grupărilor tiol în procesele enzimatică se realizează prin grupările -SH din structura enzimelor și prin substanțele tiolice cu masă moleculară mică, nelegate la proteine.

Susceptibilitatea grupărilor tiol la reacții de alchilare, acilare, oxidare, formare de mercaptide sugerează importanța compușilor tiolici în procesele catalitice. Reactivitatea acestora se datorește anionului $-S^-$, care conferă tiolilor un grad înalt de nucleofilicitate în comparație cu alte grupări funcționale.

Reactivitatea grupărilor nucleofile ale enzimelor este influențată de configurația proteinei, precum și de raporturile de vecinătate cu alte grupări.

În raport cu gradul de reactivitate a grupărilor -SH din proteine față de reactant, se poate face următoarea clasificare: grupări reactive, moderat reactive și nereactive.

Diferențierea dintre ele se face în funcție de afinitățile lor față de reactivul dat și de influența micromediului asupra reactivității intrinsece a grupării tiol (59).

Este știut că sunt enzime care își pierd activitatea prin reacție cu reactivi cu grupări -SH și că prevenirea sau reversiunea acestei inhibiții se poate realiza cu ajutorul unor substanțe de masă moleculară mică. Aceste observații au dus la concluzia implicării grupărilor tiol în activitatea enzimatică.

Suprimarea activității catalitice a unor enzime cu reactivi ai grupărilor -SH nu presupune obligatoriu și existența grupărilor tiolice în însuși centrul activ, întrucât este posibil ca blocarea unor grupări -SH în afara centrului activ să inducă o modificare conformațională care afectează nefavorabil activitatea catalitică.

1.4.1.2. Enzimele purtătoare de grupări -SH

Atomul de sulf, integrat în variate și multiple grupări chimice, deține un rol esențial în menținerea structurii tridimensionale a proteinelor, asigurând arhitectura macromoleculor cu caracter enzimatic. Prin mijlocirea atomului de sulf, complexe enzimatic pot să participe la reacții de oxidare, de fosforilare, de acetilare, de alchilare.

Grupările cu sulf din molecula unei enzime pot fi răspunzătoare de formarea complexului intermediar ES, de combinarea enzimei cu substratul. Alteori, aceste grupări afectează însăși formarea complexului activ, intervenind la unirea proteinei enzimatică cu coenzima. Atomul de sulf poate realiza și complexarea cu metalele.

Funcția tiol este esențială pentru un număr foarte mare de enzime (59, 60) (enzime tiolice), fără să se poată vorbi de un mecanism unic; în unele cazuri interferența reactivilor -SH cu grupările -SH enzimatică este ușoară și directă; în altele, reactivul poate avea contacte cu grupări -SH neesențiale sau neinteresate în menținerea centrilor activi. Reacțiile desfășurate produc o modificare a structurii spațiale a proteinei enzimatică și, indirect, o inhibare parțială sau totală a activității enzimatică. Această acțiune indirectă a fost considerată analoagă cu un efect alosteric.

Pentru enzimele cu centrul activi -SH, blocarea cu reactivi specifici se evidențiază ușor; în celelalte cazuri, deși ele pot fi puse în evidență, determinările sunt mai complexe. Astfel, la aldolază s-au stabilit 10 grupări -SH/moleculă care pot fi blocate, fără ca enzima să-și altereze activitatea; inactivarea însă a unui număr mai mare de grupări -SH/moleculă (13-14) diminuează cu circa 30% activitatea ei enzimatică. Inactivarea parțială s-ar produce printr-o denaturare sterică, grupările tiolice aflându-se în afara centrului activ și, deci, independente de acesta.

1.4.1.3. Protejarea împotriva oxidării a grupărilor SH reactive din proteine

În condițiile în care grupările -SH sunt esențiale pentru activitatea unor enzime, celula dispune de posibilitatea menținerii integrității acestor grupări. Menținerea grupărilor -SH enzimatică în stare activă este legată de protecția lor față de stressurile oxidative, protecție care se realizează, în primul rând, față de ditioli cu masă moleculară mică, cum ar fi glutathionul oxidat. Excesul de grupări disulfurice, rezultat în condițiile unei perturbări ale echilibrelor redox celulare, poate duce la inhibiția activității enzimelor -SH, ca în cazul "otrăvirii" prin disulfuri al unor enzime cu rol de control în glicoliză. Celulele multor țesuturi dispun de **disulfuri-reductaze**, al căror substrat este constituit din disulfurile simple și mixte, ale tiolilor proteici și neproteici.

O posibilitate de apărare a grupărilor -SH esențiale ar reprezenta și existența disulfurilor mixte ale proteinelor cu glutathion sau cisteină (62).

Substanțele -SH cu masă moleculară mică constituie coenzime ale unor enzime. Astfel, glutationul este coenzima sistemului glioxalază, care realizează conversia metilglioxalului la acid lactic. Prezența sistemului glioxalazic (constituit din glioxalaza I și glioxalaza II) este importantă pentru organism, în controlul creșterii celulelor.

Szent-Gyorgyi și colaboratorii au adus dovada coexistenței unui inhibitor al creșterii, pe care-l denumesc "retina", metilglioxalaza, și a unui stimulator al creșterii "promina" identic cu glioxalaza iar De La Paz a demonstrat scăderea enzimelor antioxidante din retină odată cu înaintarea în vârstă (73). Raportul acestor componente antagoniste ar fi esențial în controlul creșterii celulare. În sprijinul acestei afirmații vine constatarea făcută de Szent-Gyorgyi asupra lipsei aldocetonelor în țesutul canceros, lipsă care ar explica proliferarea fără sens a acestui țesut.

Glutationul funcționează drept coenzimă și în reacția de oxidare a formaldehidei la acid formic, catalizată de o dehidrogenază specifică. Substratul enzimei este și în acest caz un tiosemiacetal.

Cisteina poate asigura și ea conversia formaldehidei la acid formic prin formarea ATC (acid tiazolidin-4-carboxilic), depozitat preferențial în ficat și care suferă acțiunea unei dehidrogenaze specifice, cu formare de N-formil-cisteină. Radicalul formil este apoi integrat *pool*-ului celular de unități de 1-carbon.

Grupările -SH ale tiolilor cu moleculă mică participă în cadrul reacțiilor metabolice la reacții cu transfer de hidrogen și în reacțiile biologice cu transfer de radicali acil.

Se cunosc sisteme enzimatice cu rol major în metabolismul intermediar, care folosesc glutationul ca donor de hidrogen. Un astfel de sistem este glutation-peroxidaza (GPx). GPx catalizează reacția de descompunere a peroxizilor pe seama glutationului. Enzima manifestă o specificitate mai mare în raport cu tiolul (cisteina și cisteamina sunt mai active) și o specificitate redusă pentru substratul peroxidic ce poate fi reprezentat de H₂O₂ (53) și de peroxizii lipidici. Prezența GPx alături de catalaza -SH este interpretată drept o competiție a celor două enzime pentru același substrat. La concentrații mici, normale, de H₂O₂ în celulă, enzima implicată în descompunerea acesteia ar fi GPx (149).

Descompunerea peroxizilor lipidici formați in vivo este vitală pentru celulă, deoarece perturbările oxidative, produse de peroxizi asupra membranelor celulare și ale unor sisteme enzimatice esențiale, au o importanță foarte mare (116,121).

Grupărilor -SH, care condiționează capacitatea funcțională a enzimelor, li se atribuie formarea compusului intermediar enzimă-substrat sau complexarea cu metale, care au tendința de a atrage electronii proveniți de la atomul de sulf. Prin aceasta, se produce o "relaxare" a electronilor vecini grupării tiolice, fenomen care activează reacția enzimatică.

Pornind de la diferențierea care apare între centrul activ și centrul alosteric se admite că funcția reglatoare a enzimelor ar fi chiar mai sensibilă decât funcția catalitică. Enzimele cu un centru alosteric -SH au o sensibilitate excesivă față de iradierea cu raze X.

În condiții biologice, cisteina și G-SH din celule constituie principalii factori de activare, după cum produșii lor de oxidare -G-S-S-G- și cistina - sunt factori de inactivare a enzimelor -SH active.

Proteinele enzimatice intracelulare sunt mai bogate în grupări tiolice decât cele extracelulare, datorită prezenței în celulă a cisteinei și a glutationului în formă liberă. Proteinele "prenative", adică cele a căror structură terțiară este abia parțial formată, pot fi atacate mai ușor la nivelul grupărilor tiol.

Sensibilitatea remarcabilă a grupărilor tiol-enzimatice este diminuată prin suprapunerea peste fenomenul inhibiției a celui de protecție (115). Este cunoscută comportarea enzimelor -SH la adăugarea reducătorilor în sistem. Astfel, cisteina, glutatiunul redus, acidul ascorbic(73,80) determină un mecanism de inhibare a acțiunii inhibitorului, prin menținerea unui potențial redox favorabil formelor -SH ceea ce reprezintă, în fapt, eliberarea enzimei în forma sa activă printr-un fenomen de protecție naturală.

Acidul ascorbic este unul dintre cei mai eficienți reducători cu structură simplă. Astfel s-a constatat o activitate antioxidantă a acestuia asupra eritrocitelor la iepure și refacerea activității hexokinazei (103, 104).

O astfel de protecție împotriva oxidării și menținerii în formă redusă a grupărilor SH- active o constituie și o serie de compuși naturali ce se găsesc în plante, iar una dintre acestea o constituie și *Allium sativum*.

624.494 / 1810

CAPITOLUL 2

2.1.COMPOZIȚIA CHIMICĂ AL ALLIUM SATIVUM

Allium Sativum face parte din marea familie a Liliaceelor. Această plantă ca și altele din genul Allium a fost utilizată de secole pentru valoarea de condiment picant și aromatizant, și pentru proprietățile ei medicinale.

Aceste proprietăți au fost intens studiate în ultimul deceniu. Allium Sativum s-a dovedit a fi o plantă cu activitate anti microbială, antifungică și insecticidă foarte importantă.

2.1.1. COMPOZIȚIE GENERALĂ

În literatură (295) este prezentată compoziția generală a Allium Sativum, crud și prelucrat sub formă de pudră sau sare.

Compoziția generală a lui Allium Sativum

Tabelul 2.1

Allium Sativum	Umiditate %	Proteine %	Lipide %	Ghiceride %	Genușă %	Energie cal/100
Crud	61.3	6.2	0.2	30.8	1.5	137
	63.8	5.3	0.2	29.3	1.4	140
Tip Pudră	6.1	3.0	6.2	31.2	53.5	-
Tip Sare	10.0	8.8	5.6	24.5	72.2	-

În toate cazurile, și la alte specii de Allium, componența principală a substanțelor solide o constituie glucidele.

Conținutul în hidrați de carbon variază considerabil, funcție de locul și modul de cultură diferențiat.

2.1.2. MICROELEMENTE

Compoziția procentuală în microelemente ale plantei Allium Sativum este prezentată în tabelul 2.2 (comparativ cu compoziția la Allium Ceppa). Au fost efectuate analize fluorimetrice obținându-se valori cuprinse între 2-30 $\mu\text{g}/100\text{ g Se}$. De asemenea au fost găsite următoarele elemente (56):

Ni (43 $\mu\text{g}/100\text{g}$), Co (28 $\mu\text{g}/100\text{g}$), Cr (23 $\mu\text{g}/100\text{g}$), V(10 $\mu\text{g}/100\text{g}$), Mo (1 $\mu\text{g}/100\text{g}$), Ti (1 $\mu\text{g}/100\text{g}$), Ce și Li (67 μg -114 $\mu\text{g}/100\text{g}$). Allium Sativum conține cantități destul de mari de metale alcaline (157).

Compoziția în microelemente ($\mu\text{g}/100\text{g}$) al *Allium Sativum*.

Tabelul 2.2.

Allium	Sativum	Cepa
	50 - 90	190 - 540
P	390 - 460	200 - 430
K	100 - 120	80 - 110
Na	10 - 22	31 - 50
Mg	43 - 77	81 - 150
Al	0.5 - 1	0.5 - 1
Ba	0.2 - 1	0.1 - 1
Fe	3.0 - 3.9	1.8 - 2.6
S	0.1 - 0.7	0.8 - 0.7
B	0.3 - 0.6	0.6 - 1
Cl	0.17	0.05 - 0.04
Zn	2.0 - 3.1	1.5 - 2.8
Mn	0.2 - 0.6	0.5 - 0.6
Cu	0.3 - 0.5	0.5
S	50	51
Cl	36	20

2.1.3 . VITAMINE

Conținutul în vitamine este prezentat în tabelul 2.3, comparativ cu *Allium Cepa*:

Compoziția în vitamine ($\text{mg}/100\text{g}$) în *Allium Sativum*

Tabelul 2.3.

Allium	vit. C	vit. B ₁	vit. B ₂	vit. B ₆	vit. E tocoferol	vit. A retinol
Sativum bulb	15	0.8	0.25	0.08	0.5	0.10
Cepa bulb	10	urme	0.1	-	0.2	0.14

În frunzele verzi-conținutul în vitamina C este mult crescut ($150\text{mg}/100\text{g}$ material proaspăt) constituind o valoare nutrițională deosebită.

Vitamina E (tocoferol) a fost determinată de Yamaguchi și Masushita (168) - $0,10\text{mg}/100\text{g}$, + $0,01\text{mg}/100\text{g}$ și $0,08\text{mg}/100\text{g}$ - la ceapa și $0,09\text{mg}/100\text{g}$ - la usturoi.

În planta proaspătă, nivelul tocoferolului este mai crescut ($0,07\text{mg}/100\text{g}$ - ceapa, $0,55\text{mg}/100\text{g}$ - usturoi)(169). Prin congelare, are loc o pierdere de 14 - 69% din această vitamină. Doss (82) a examinat potențialul unui astfel de material ca hrană pentru animale; produsul crud având un conținut proteic de 10% a fost supus fermentației pentru a îndepărta compușii cu sulf, nedorii. Prin acest proces scade

conținutul în proteină (7%) dar crește nivelul tiaminei la o valoare mai mare decât prin oricare altă metodă utilizată pentru îndepărtarea compușilor nedoriți cu sulf (ex. cu abur).

2.1.4. ACIZI GRAȘI, LIPIDE, CERURI

Compoziția lipidică a acestor specii a fost mai puțin studiată, Eichenberger și Grob (88), prin extracția lipidelor din planta verde, în eter, au găsit un conținut de aproximativ 4% din greutate, la ceapă, față de 0,43% în usturoi.

Acizii palmitic (C16), oleic (18:1^{Δ9}) și linoleic (C18:2^{Δ9,12}) depășesc 80% din total. Raportul între acizii grași saturați și nesaturați este de 1.87 la ceapă și 1.92 la usturoi.

Compoziția în acizi grași a lipidelor din *Allium Sativum* (%)

Tabelul 2.4

Acizi	Saturi	Neutri	Glicolipide	Fosfolipide
C ₁₀	urme	0.6	1	urme
C ₁₂	urme	urme	1	urme
C ₁₄	-	-	1	-
C ₁₆	27-28	16-20	32-34	32
C _{16:1} ^{Δ9}	urme	1	2	urme
C ₁₈	0.5	1-5	2-5	urme
C _{18:1} ^{Δ9}	7-11	17-18	5-6	8-12
C _{18:1} ^{Δ9,12}	57-63	60-70	40-48	55-61
C _{18:1} ^{Δ9,12,15}	2-3	5-6	8-13	1
C ₂₀	-	-	-	-

Stoianova Iovanova și Tzutzulova (286) - au studiat conținutul în acizi grași liberi și legați din usturoi, prin cromatografie în strat subțire. Nu au fost obținute diferențe mai mari în diferitele țesuturi ale plantei.

Kamanna și Chandrasekhara (147) - au izolat 600mg. lipide/100g usturoi proaspăt utilizând amestecul: cloroform, metanol și mai apoi au separat fracțiuni de lipide neutre, glicolipide și fosfolipide (62.6, 14.0 și 2.34% din lipidele totale).

Yang și Shing (328) - au izolat 310 - 342mg. lipide/100g din două soiuri de usturoi, utilizând aceeași metodă de extracție ca și Kamanna și Chandrasekhara, dar găsind cantități diferite la fracționare, și anume: lipide neutre (36 - 44%), fosfolipide (36 - 39%) și glicolipide (20 - 24%).

Pe lângă lipidele neutre, trigliceridele dețin procentul cel mai ridicat (80 - 84%), fiind însoțite de cantități mici de steroli liberi, acizi grași liberi și esteri ai sterolilor. Principalii acizi grași detectați ca și componenți ai trigliceridelor sunt acizii: lauric, miristic, palmitic și linoleic.

Fosfolipidele conțin un procent ridicat de acid palmitic și linoleic; iar în fosfatidilcolină predomină acidul oleic. Lisofosfatidilcolina și lisofosfatidiletanolaminele, pe lângă acizii palmitic și linoleic, conțin apreciable cantități de acid lauroleic (329).

La rândul lor fosfatidilcolina, etanolamina și serina constituie 85% din compoziția fosfolipidelor la care se adaugă și cantități mici de inozitolfosfolipide și de acid fosfatidic.

Dintre glicolipide, în usturoi găsim prezente: digalactozildigliceride 10.1%, sterolglicozide 15.6%, cerebrozide 8.1%, acilsterolglicozide 38.6% și monogalactozil digliceride 22.5%.

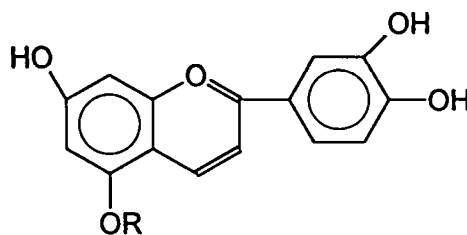
Toate aceste determinări au fost efectuate prin metoda French și Andersen (112). Aceștia au izolat lipidele în curent de azot, prin extracția în hexan.

2.1.5. AMINOACIZI

Numeroase studii au fost efectuate, în special, asupra aminoacizilor cu conținut în sulf, existând mai puține lucrări în ceea ce privește compoziția speciei *Allium Sativum* în aminoacizi liberi. Utilizând cromatografia pe hârtie, Knon și Bernhart (152) au găsit principalii aminoacizi liberi ca fiind: arginina, acidul glutamic, fenilanina, leucina, izoleucina, tirozina, lizina și metioninsulfoxidul. Aceste rezultate au fost confirmate de Matikkala și Virtanen (182) și Schuphan și Schwerdtferger (263) care au arătat că atât arginina cât și acidul glutamic funcționează ca sursă de azot. Spre deosebire de ceilalți aminoacizi care nu suferă nici o modificare, s-a observat, că în timpul maturizării plantei are loc o creștere a cantității de arginină (67) cu 29% și acid glutamic cu 7%. Mai mult, cantitatea maximă de arginină a fost găsită în învelișul intern al bulbului, cu 35% mai mult, față de învelișul extern. Ketiku (150) a analizat compoziția în aminoacizi ai hidrolizatelor proteice ale plantei *Allium Sativum*, găsind conținutul total în aminoacizi ca fiind de 305 - 374mg/100g bulb crud, iar în frunze și semințe, mult mai mare, 735mg/100g crud (77,112, 266, 306).

2.1.6. ANTOCIANINE

Du și Francis (84) - au separat dintr-un extract de usturoi prin cromatografie pe hârtie, șapte benzi pigment. Una din aceste benzi a fost identificată ca fiind cianidin 3 glucozid (a). Autorii au sugerat că majoritatea pigmentilor izolați ar putea fi acilați și au arătat importanța majoră a alegerii sistemului de solvenți pentru extracția și izolarea antocianinelor acilate, punând în evidență sensibilitatea mărită a acestora față de prezența unui acid mineral prezent în amestecul de extracție.



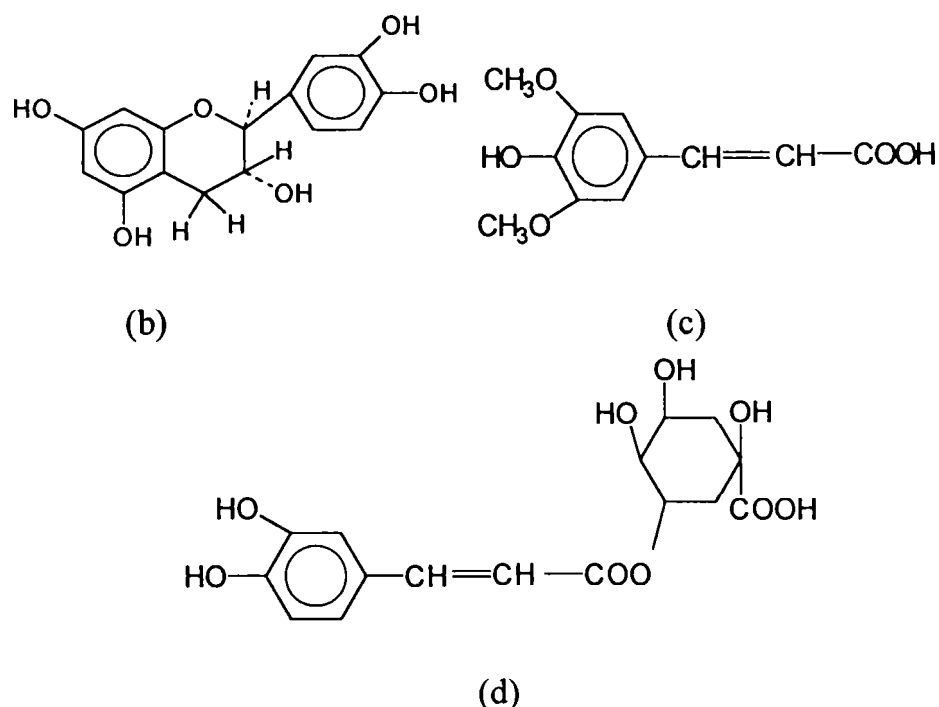
(a)

Aceiași autori au sugerat rezolvarea acestor probleme prin utilizarea tehnicilor moderne de analiză (84).

2.1.7. FENOLI

Este presupusă existența catecolilor (b) (100), a acidului sinapic(c) și acidul clorogenic (d) (aceștia din urmă au fost găsiți într-o concentrație de 3.5 - 4.5mg /100g praf de *Allium sativum*). Aceștia sunt concentrați mai ales în învelișul bulbilor; s-a observat că rezistența acestei specii față de fungii parazite, cum ar fi *Prenospora*

Destructor este invers proporțională cu conținutul de polifenoli și anume: în țesuturile sănătoase există o concentrație scăzută de polifenoli față de cazul în care o concentrație mărită a fost evidențiată în țesutul infestat de fungii.



2.1.8. GLUCIDE

O serie de cercetători au studiat compoziția în glucide a speciei *Allium*; Studiile din literatură (66, 237, 283) asupra glucidelor din *Allium Sativum* și *Allium Ceba* au identificat prezența următoarele monoglucide: glucoza (1.4%), fructoza (1.2%) , sucroza(7.0%) , scordoza (53%) din materialul uscat, precum și 1-fructofuranozilzaharoza (1-chestoză) și 6-fructofuranozilzaharozei (neochestoză) precum și a unor enzime capabile să transfere restul fructozil de la triglucide pentru formarea de tetraglucide și diglucide (zaharoza).

Aceiași autori (66) au arătat că prin hidroliza enzimatică a acestor fructozani, considerați ca și glucide de rezervă, se obține fructoza care poate avea o funcție adițională de facilitare a osmozei în timpul creșterii bulbului.

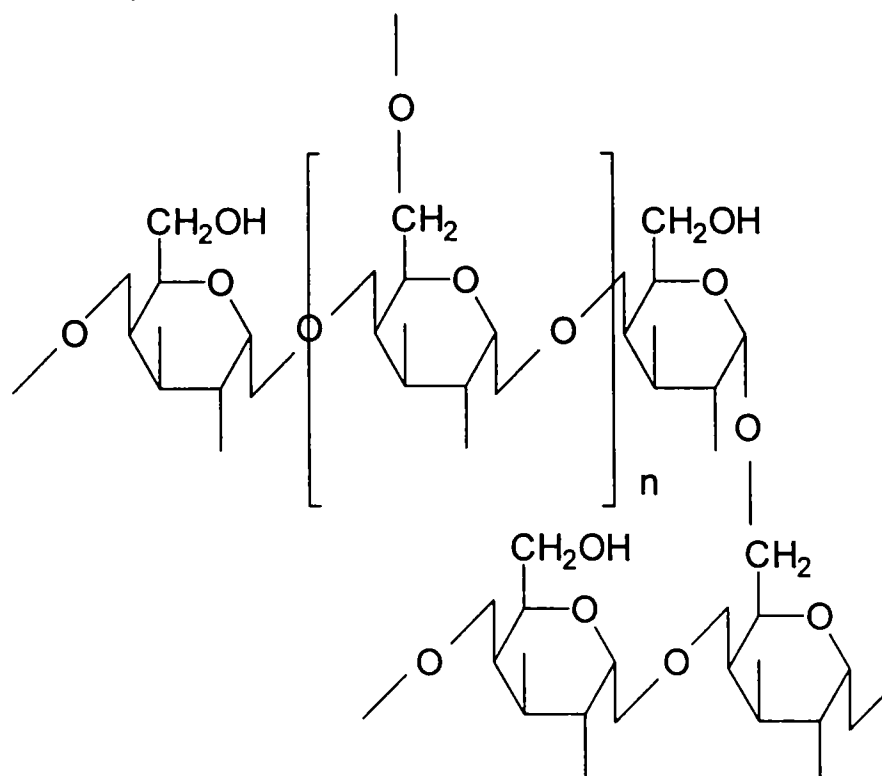
Spre deosebire de ceapă, usturoiul conține fructozani cu grad de polimerizare mai mare de 50 (283).

Deasemenea s-a evidențiat și faptul că o creștere a cantității de substanță uscată este corelată cu creșterea conținutului de fructozani. În nici una din plantele speciei *Allium* nu s-a evidențiat prezența polihexitolilor sau a rășinilor.

Este posibil ca rata mare a concentrației de fructozani din usturoi să fie o consecință a concentrației mult mai ridicată a substratului. După cum s-a afirmat anterior, bulbul de usturoi conține cantități mari de tetraglucide: scordoza un tetramer care conține patru monomeri de α D-fructofuranoză legați prin legături 2-2 α și 2-6 α (151).

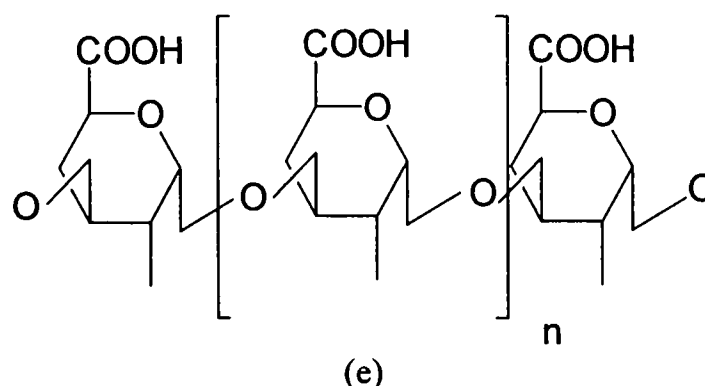
După extragerea în apă fierbinte a bulbilor de usturoi în extract a fost pus în evidență un amestec de poliglucide de tip poli - α D – Gal_p , - α D – Fru_f , - α D – Glu_p , - α D – Ara_p .

Studiile chimice efectuate în legătură cu hidroliza și oxidarea au condus la postularea prezenței unității de α D - galactopiranoză legată prin legături 1-4 α , 1-6 α glicozidic de tip inulinic (71):



2.1.9. SUBSTANȚE PECTICE

Învelișul exterior al bulbilor de ceapă și de usturoi (9), care rămâne ca produs secundar la exploatarea, în industria alimentară, a acestor plante, s-a dovedit a fi o sursă foarte bună de substanțe pectice (317, 2) menționându-se un randament de 27% la obținerea pectinelor din învelișul exterior al usturoiului. Oxidarea cu prioritate a produsului izolat a pus în evidență o structură liniară cuprinzând ca unitate structurală acidul α D-galacturonic (e) legat 1-3 α , fără a prezenta ramificații.



S-a dovedit că pectinele derivate din specia *Allium* sunt de calitate superioară, prin hidroliza acestora obținându-se α D-galactoză, α D-arabinoză și acid α D-galacturonic (250).

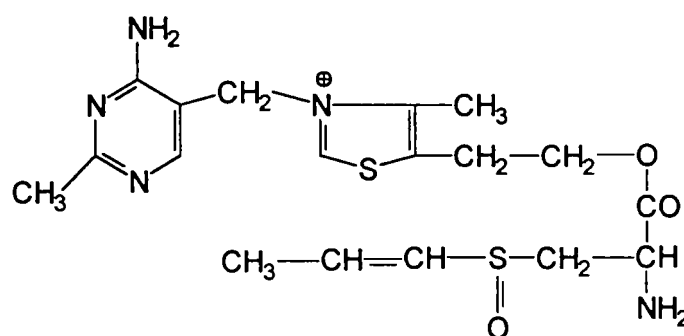
Conținutul în pectine variază între 1.1-5.6% .

2.1.10. ALȚI COMPONENTI

2.1.10.1. ALLITIAMINA

Prin reacția tiaminei cu un extract alcoolic de usturoi la pH = 8 (114s-a obținut un produs cu reacție negativă față de tiocrom, *in vitro*, dar care își menține efectul *in vivo*. Mai mult decât atât, compusul pare a fi absorbit mai rapid în tractul intestinal decât tiamina însăși. Compusul a fost denumit allitiamina (f). Formarea allitiaminei este dependentă de pH; un randament maxim se observă la o valoare a pH-ului de 8. Temperatura optimă de obținere este de 65°C - temperatură considerată ca cea mai indicată pentru preîntâmpinarea formării S-2propenilsulfoxidului.

Prin reacția cu cisteina dă naștere la tiamină și S-(1-mercapto-2-propenil)-L-cisteina (183).



(f)

Formarea allitiaminei este dependentă de pH; un randament maxim se observă la o valoare a pH-ului de 8. Temperatura optimă de obținere este de 65°C - temperatură considerată ca cea mai indicată pentru preîntâmpinarea formării S-2propenilsulfoxidului.

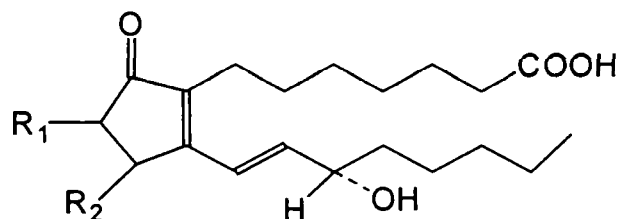
Spre deosebire de tiamină, allitiamina nu este degradată enzimatic de tiaminază și tot odată dovedește o stabilitate mult mai bună la încălzire.

2.1.10.2. SCORDININA

Scordinina este un complex tioglucozidic, cu structură încă neelucidată care se dovedește a fi un important ingredient natural al usturoiului (132).

2.1.10.3. PROSTAGLANDINELE

Prezența prostaglandinei A1 (g) în bulbul proaspăt, pare a fi răspunzătoare de capacitatea hipotensoare a speciei *Allium* (19).



(g)

2.1.10.4. STEROLI ȘI GLICOZIDE STEROLICE

Cu ajutorul cromatografiei de gaz, Oka și colaboratorii (220) au arătat prezența colesterolului, campesterolului, α -sitoserolului și stigmasterolului în *Allium Sativum*. Concentrația acestor compuși descrește din exterior spre interiorul bulbului, stigmasterolul fiind absent din țesutul intern al bulbului.

Smocziewicz și colaboratorii (282) au examinat plantele aparținând speciei *Allium* din punct de vedere al conținutului în saponine. Conținutul total în saponine, determinat prin cromatografie în strat subțire a fost de 0.021% din bulbul proaspăt. Hidroliza saponinelor, urmată de izolarea și analiza agliconilor, a relevat prezența sitosterolului.

Cercetătorii ruși au investigat efectul antitumoral, activitatea hemolitică și toxicitatea naturală a saponinelor (sterolglicozidelor) (165).

2.1.10.5. ANTIOXIDANȚI

Multe plante din specia *Allium* printre care și usturoiul, prezintă activitatea antioxidantă după modelul acidului linoleic (208,209,218,246).

Autorii demonstrează că activitatea antioxidantă a acestei plante a fost mărită prin încălzirea cu microunde sau prin fierbere. Aceași autori au izolat compuși cu S din usturoi, supus fierberii, arătând că și în aceste condiții usturoiul posedă activitate antioxidantă. Cei mai activi au fost sulfoxizii substituiți a S - alchenilcisteinei care au dovedit un efect antioxidant; acest efect crește odată cu creșterea numărului de atomi de carbon ai alchenelor.

Totuși activitatea antioxidantă scade în usturoiul supus fierberii și în sulfoxidul S-(2-propenil)-Lcisteinei supus tratamentului cu allinază (94).

Pratt D.E. și Watts B. (246) au arătat că prezența quercitinei influențează proprietatea antioxidantă a sulfoxizilor; de asemenea același efect ca al quercitinei îl au și unele flavone aglicon.

În afara compușilor menționați mai sus, în *Allium Sativum* a fost identificată prezența acidului oxalic, acidului citric, malic, piruvic, ajone (268) alături de alți acizi neidentificați (91).

2.2. COMPUȘII RĂSPUNZĂTORI DE AROMĂ ȘI PROPRIETĂȚILE FIZIOLOGICE ALE SPECIEI ALLIUM SATIVUM

Specia *Allium* cuprinde o serie de plante care dețin proprietăți aromatizante datorită cărora acestea au fost utilizate cu secole înainte.

Mulți cercetători s-au ocupat de studiul compușilor răspunzători de aceste proprietăți, compuși care s-au dovedit ulterior ca având și o serie de efecte fiziologice(251,267).

2.2.1. COMPUȘII RĂSPUNZĂTORI DE AROMĂ, DIN ALLIUM SATIVUM

Primele și cele mai importante studii asupra compoziției uleiurilor odorizante obținute din usturoi, au fost efectuate de Wertheim și mai târziu de Semmler și Sakamoto(258). Prin distilarea fracționată a uleiului crud, a fost identificat diallildisulfitul, dialliltrisulfitul și polisulfitul și în mod eronat dietildisulfitul.

În prezent aceste rezultate s-au dovedit a fi eronate dar totuși sunt utilizate ca date de referință privind studiul compoziției uleiurilor volatile.

O altă caracteristică a acestor arome o reprezintă faptul că ele nu se regăsesc în planta intactă ci numai în momentul în care țesutul celular este distrus și intervin anumite reacții enzimatic.

Rundqvist (256) în 1909 a considerat ca precursor un glicozid și numai după 40 ani a fost izolat compusul purificat, ca fiind un sulfoxid S-substituit al cisteinei ,de către cercetătorii Stoll și Seebeck (288-291).

Lucrările acestor cercetători , împreună cu ale lui Lehmann, Cavallito și Bailey (49,50), au condus la identificarea principiului antibacterian din usturoi și la realizarea legăturii dintre acesta și principiile aromatizante.

O serie de alți cercetători (4, 47, 313) s-au ocupat în mod special atât de biosinteza lor cât și de studiul procesului enzimatic.

Grechkin a determinat prezența subcelulară a unei diviniziter sintetaze și a stabilit substraturile regio- și stereospecifice caracteristice ale acestei enzime (124, 125).

Acest studiu a început să fie aprofundat și de cercetătorul japonez Ueda,J. care a continuat aceste studii cu privire la principiile aromatizante atât ale *Allium sativum* dar și a *Allium cepa* (306, 307).

2.2.1.1. COMPUȘII CU SULF, NEVOLATILI

Genul *Allium* reprezintă o sursă naturală, importantă, de sulf. Ettala (93) și Virtanen(313) au identificat 21 de componente radioactive după 7 zile de la injectarea de sulfat cu S marcat, în *Allium Sativum*. Pe lângă cisteină, metionină și derivații lor cei mai importanți și răspunzători de aromă, sunt sulfoxizii cisteinei S-substituite și γ - glutamil peptidele. Compușii principali sunt prezentați în figura 2.1.:

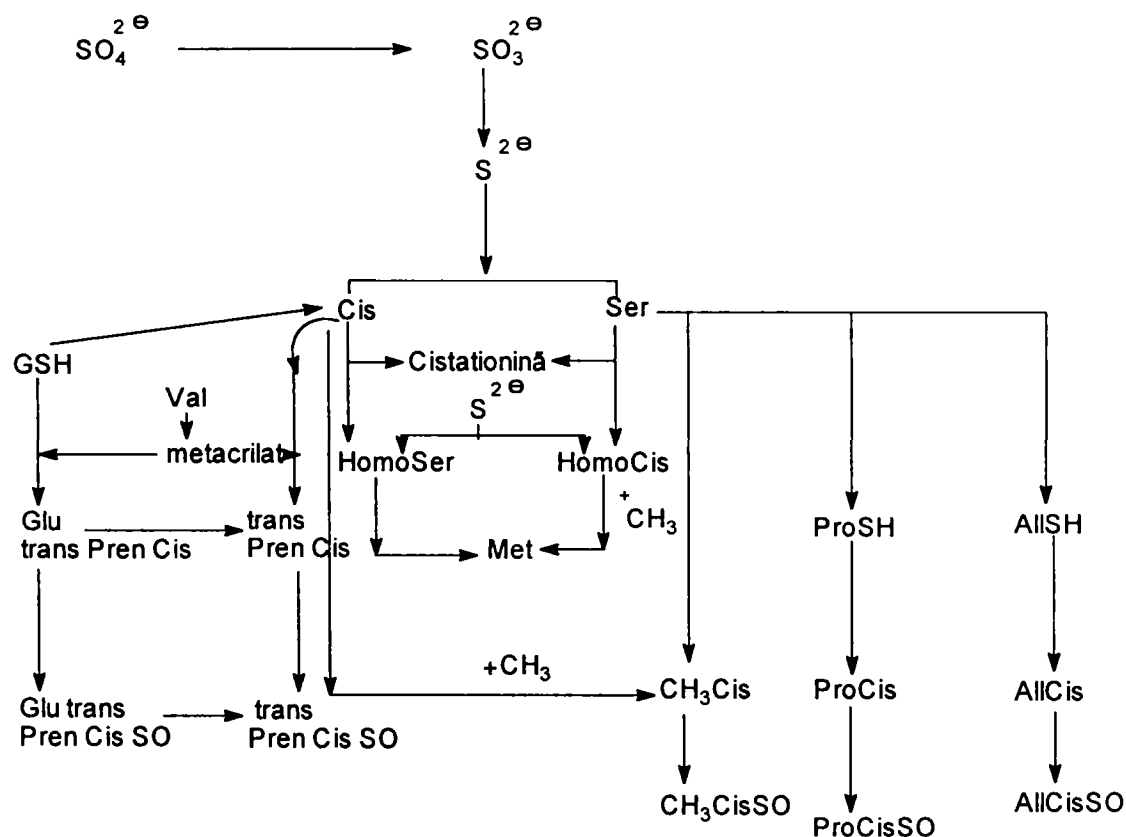


Fig 2.1. Relațiile metabolice a câtorva compuși cu sulf în speciile *Allium* (unde Pro-popil, Pren-propenil, All- alil)

Acești compuși se găsesc în bulbul intact și sunt convertiți prin procese enzimatic în compuși aromatizanți care se găsesc în interrelații apropiate cu precursorii lor.

Nivelul compușilor cu sulf în *Allium* depinde foarte mult de raportul exogen al fertilizării solurilor cu sulfati, cât și de partea plantei care intră în studiu.

Cu toate acestea conținutul în L-cisteină, L-cistină și L-metionină sunt relativ mici, acesta fiind un semn al metabolizării lor rapide.

Nu au fost evidențiate reacțiile de reducere ale metioninei în vivo.

S-substituenții cisteinei se evidențează rapid în vivo (120) ei găsindu-se sub forma sulfoxizilor (+) corespunzători.

1. ALCHILSULFOXIZII CISTEINEI

Alchilsulfoxizii cisteinei conferă în principal efectul de aromatizant și condiment al plantei *Allium Sativum*. De asemenea constituie precursori importanți ai componentelor cu activitate biologică(17).

Primul compus, caracterizat de Cavallito, Bailey și Semmler, ca având activitate antibiotică, a fost (+)S- (2-propenil)- L- cistein sulfoxidul.

Importanța acestor compuși a fost studiată de cercetătorii japonezi Fujiwara , Yoshimura M. și alții (114).

Primul și cel mai important dintre acești compuși cu sulf (273) este (+) S- 2-propenil-L-cistein sulfoxidul și a fost considerat ca un triumf al chimiei clasice a compușilor naturali. Dintre componenții speciei *Allium*, cel mai bogat în această substanță este *Allium Sativum* (372mg/100g bulb crud) (291).

(+) S-(1-propenil)-L-cistein sulfoxidul a fost descoperit ca precursor al factorului lacrimator, cât și al cicloalinei, pentru prima dată în ceapă; el nu a fost detectat în usturoi.

Sugii (292) și colaboratorii au identificat tioeterul corespunzător, sugerând lipsa unei enzime (sulfoxidază) care să transforme tioeterul (și astfel explică lipsa efectului lacrimator la usturoi).

Conținutul în compuși S-vinil-, S-etil- și S-butil-L-cistein sulfoxizi, este prezumtiv dar nu a fost confirmat. Compușii etilici se formează în mod natural, în literatură (32,33) sugerându-se necesitatea unei reexaminări a prezenței acestor compuși prin metode cromatografice moderne și tehnici de manipulare noi ale acestora. În literatură (208) s-a descris caracterul antioxidant al extractului de *Allium Sativum* concomitent cu existența S-butil-L-cistein-sulfoxidului. Acest compus este presupus ca fiind precursor (în condiții alcaline) al nor-cicloalinei .

2.γ - GLUTAMIL PEPTIDELE

În *Allium Sativum* a fost identificată prezența a 3 (4) γ-glutamil peptidelor. Acești compuși , care în mod aparent constituie substanțe de rezervă , sunt rapid hidrolizate în procesul de germinație a semințelor . Studiul acestor peptide a necesitat investigații îndelungate efectuate prin separări pe un analizor de aminoacizi , prin electroforeză bidimensională și cromatografie. Nu a fost distinsă activitatea unor transpeptidaze.

Aceste studii nu au fost complet elucidate și nu a fost elucidat nici rolul major pe care îl joacă aceste glutamilpeptide. Probabil că aceștia sunt compușii care conferă aroma acestei specii , conținând aproximativ 90% din legăturile organice cu sulf(35,38).

2.2.3. ENZIMELE RĂSPUNZĂTOARE DE CARACTERUL AROMAT DIN ALLIUM SATIVUM

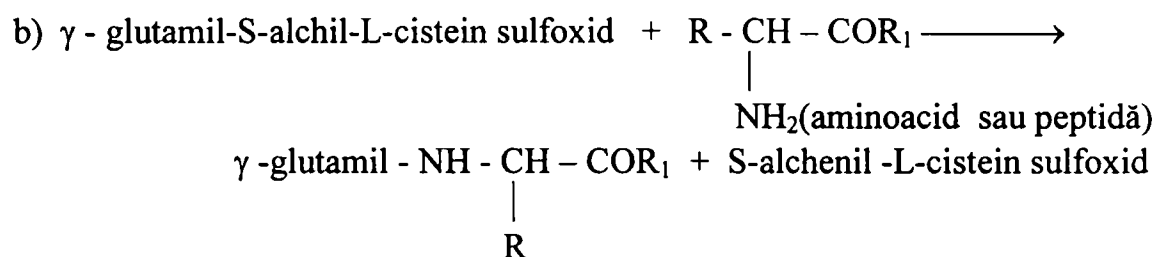
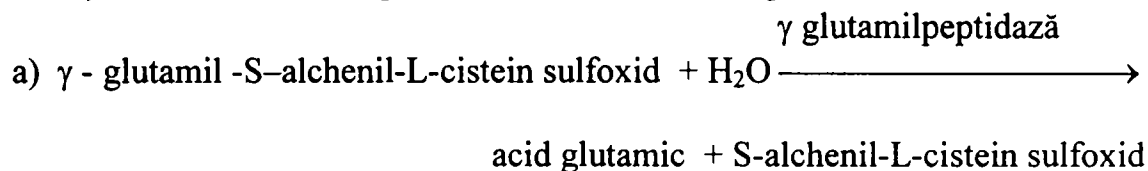
2.2.3.1 Allinaza (S-alchil-L-Cisteinsulfoxid liaza).

Allinaza va fi prezentată în subcapitolul 2.3 .

2.2.3.2 Glutamil peptidaza și transpeptidaza

În lucrările de cercetare ale lui Whitaker (324) s-a stabilit că mai mult de 50% din caracterul aromat se poate datora γ -L-glutamil trans(+)-S-(1propil)-L-cistein sulfoxidului. Apariția acestei substanțe se datorează hidrolazei (γ -L glutamilpeptidazei) și transferazei (γ -glutamil transferazei)(160,161).

Reacțiile care au loc sunt prezentate de Whitaker, după cum urmează:



2.2.4. BIOSINTEZA PRECURSORILOR CU CARACTER AROMATIZANT

Cele mai multe studii în această privință au fost efectuate de către Granroth (123) (care a utilizat atât frunzele cât și bulbul de ceapă și usturoi) și Whitaker (323).

Granroth a prezentat în lucrările sale relația între compușii cu sulf, din punct de vedere al metabolismului; rezultatele obținute sunt prezentate în figura 2.2.

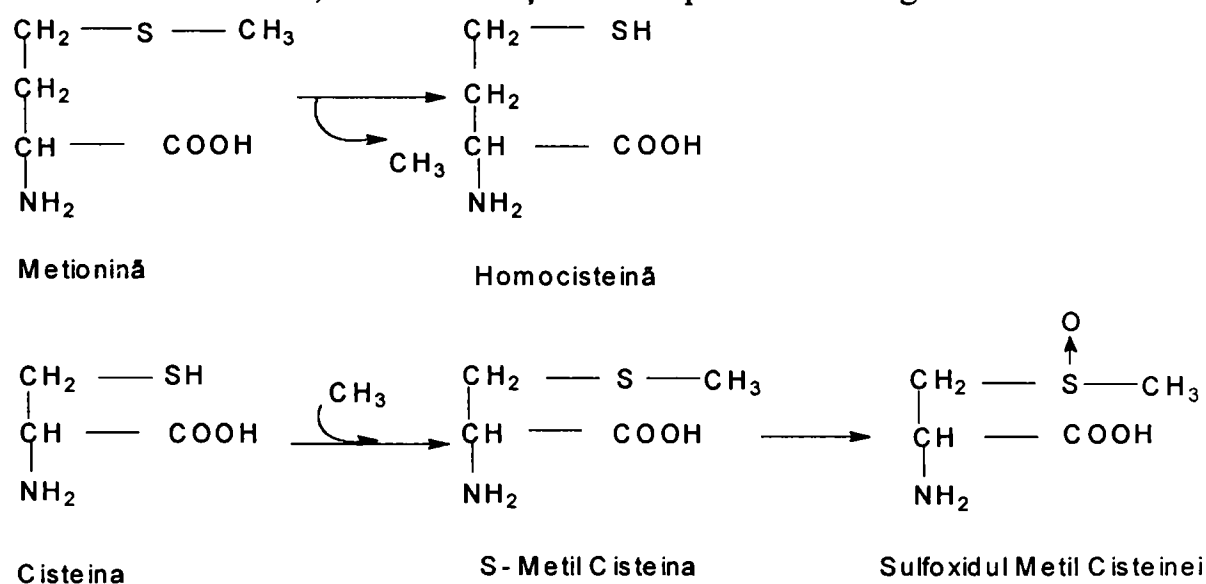


Fig.2.2. Transferul grupei metil

În acest sens, autorul (123) arată că în timp ce sulfoxizii (+) S-propil-, respectiv (+) S-(2-propenil)- și (+) S-metil-L-cisteinei sunt considerați ca derivați ai serinei, sulfoxidul trans (+) S-(1-propenil)-L-cisteinei derivă chiar de la cisteină.

Aceste concluzii derivă din studiile efectuate cu ajutorul atomilor marcați de sulf (S_{35}) și carbon (C_{14}), fiind regăsite în mod detaliat în lucrarea lui Granroth (123).

2.2.4.1. SULFOXIDUL (+) S-METIL L-CISTEINEI

Biosinteza acestui compus este destul de complicată, presupunând un transfer al grupei - CH_3 de la metionină la cisteină. S-a acceptat acest mecanism datorită faptului că s-a observat încorporarea rapidă a grupei metil - ^{14}C marcată din metionină la S-metil cisteină, respectiv a sulfoxidului acesteia. Acestea sunt prezentate în figura 2.3.

Se presupune, de asemenea, și transferul grupei S-metil. Astfel metionina marcată (S_{35}) este metabolizată rapid trecând în S-metil cisteină și sulfoxidul ei cât și în sulfoxidul S-(1-propenil) L-cisteină, dar se observă că nu în sulfoxidul de S-propil sau S-(2-propenil) (23,36).

În acest mod s-a concluzionat că aceste rezultate se explică prin două mecanisme de biosinteză și anume:

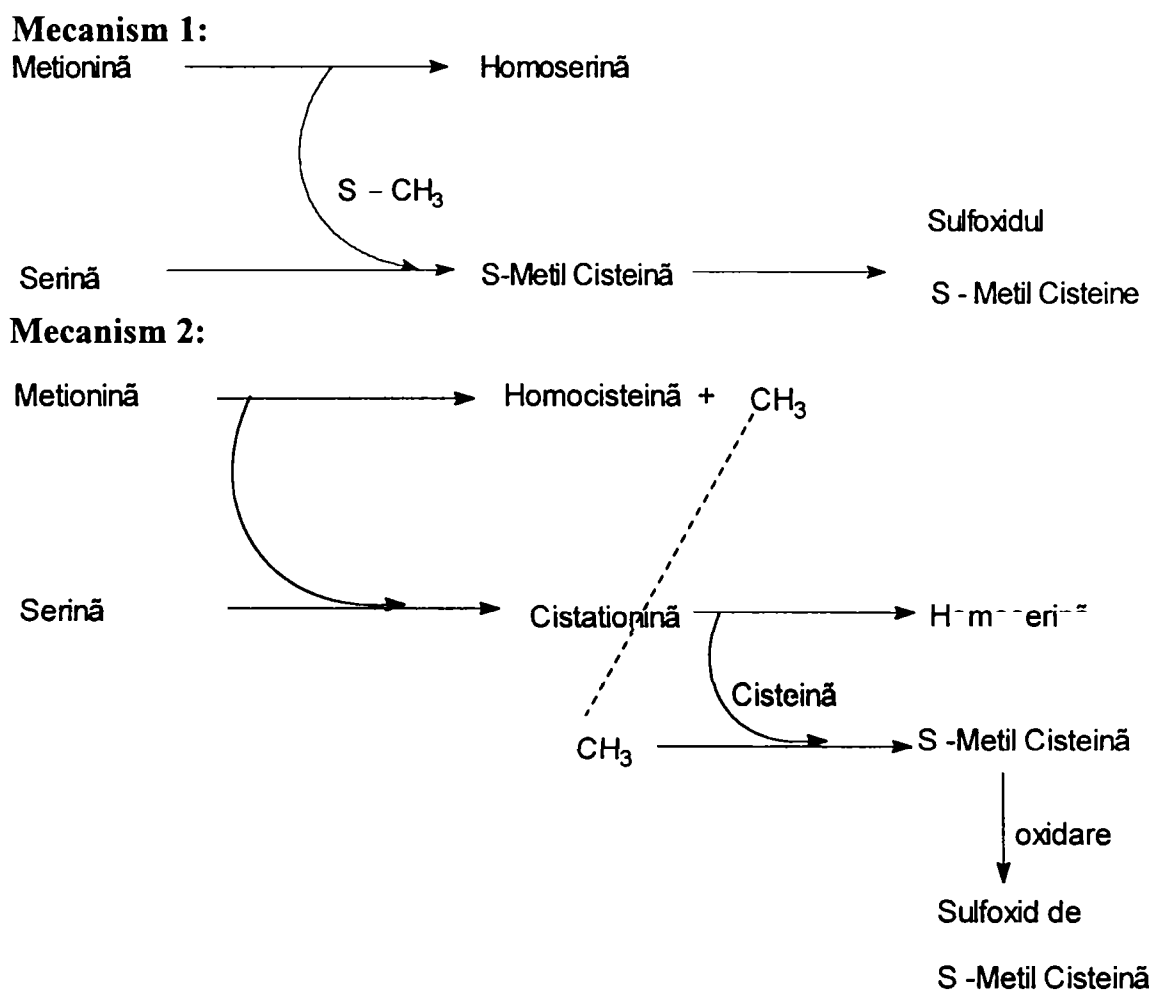


Fig. 2.3. Mecanismul de biosinteză a S-metilcistein sulfoxidului

2.2.4.2.SULFOXIZII (+) S-PROPIL-, (+) S-(2-PROPENIL) L-CISTEINEI

Același Granroth (123) a arătat că atât (+) S-(2-propenil)- cât și (+) S-etil L-cistein-sulfoxizii sunt puternic vehiculați în țesuturile de ceapă și usturoi, aceștia regăsindu-se atât în frunze cât și în bulb. Atât S-(2-propenil)-L-cisteina cât și γ -glutamyl-S-(2-propenil)-L-cisteină (nici una dintre ele nu este afectată de acțiunea allinazei) sunt capabile să acționeze ca surse de grupe tioalchil(36).

2.2.4.3.SULFOXIDUL DE TRANS (+) S-(1-PROPENIL) L-CISTEINĂ

Biosinteza acestui compus a fost studiată de Suzuki și colaboratorii (293) sugerând mecanismul prezentat în figura 2.4.

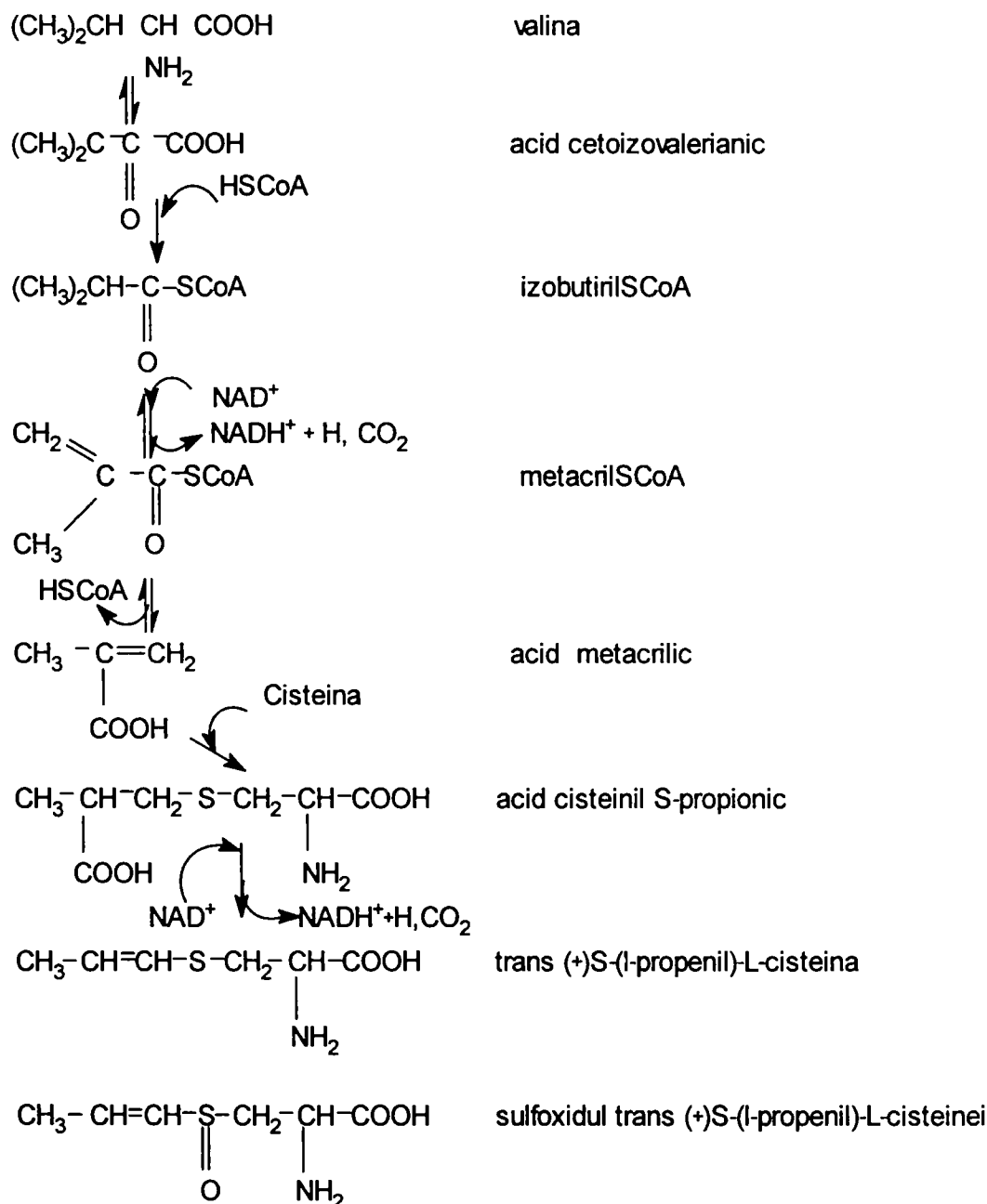


Fig. 2.4. Biosinteza sulfoxidului trans S (+) (l-propenil)-L-cisteina (293)

Acest mecanism nu este pe deplin elucidat, necesitând continuarea studiului.

Etapă inițială, incluzând și formarea S-(2-carboxipropil)-L-cisteinei (a cărei structură a fost complet elucidată de Parry și Naidu (239)) face parte din metabolismul intermediar normal, subetapele fiind o caracteristică a speciei *Allium*.

Grupa trans (1-propenil)- se formează din 2-carboxipropil printr-o decarboxilare oxidativă, etapă care decurge separat de oxidarea atomului de S. Această reacție de oxidare a atomului de S decurge rapid, fiind aparent ireversibilă.

Reacția de formare a glutatationului și a acidului metacrilic (sau a metacrilil SCoA) nu a fost dovedită concret ca etapă intermediară în biosinteza trans (+) S-(1-propenil)-L-cisteină (pe calea derivatului - glutamil) și a sulfoxidului său corespunzător.

Granroth (123) a arătat că acest proces trebuie să fie studiat și în bulbii maturați datorită faptului că aceștia conțin o hidrolază capabilă să scindeze legăturile peptidice a γ -glutamil peptidelor și de asemenea a γ -glutamil transpeptidazei (266).

Nu a fost încă elucidată calea formării S-(carboximetil)-L-cisteinei, S-(2-carboximetil)-L-cisteinei, S-(caboxiizopropil)-L-cisteinei și a γ -glutamil S-(carboxipropil)-L-cisteinil-glicina.

Swimmer (294), a arătat că trans (+)-S-(1-propenil)L-cistein sulfoxidului este precursorul major, nu numai a principiilor lacrimatorii ci și a celor de aromatizare în bulbul crud.

Concluzia acestor cercetători a fost că sulfoxizii alchilcisteinei sunt din punct de vedere metabolic, inerti, constituindu-se mai repede ca produși finali, decât ca intermediari.

Acumularea lor în *Allium*, pe lângă proprietățile aromatizante și fiziologice asigură și rol de protecție față de daunele mecanice produse țesuturilor sau de cele aduse de insecte.

Acest mecanism nu este pe deplin elucidat, necesitând continuarea studiului.

2.2.5. BIOGENEZA COMPUȘILOR AROMATIZANȚI

Biogeneza acestor compuși a fost studiată în mod exclusiv atât din punct de vedere al structurii chimice, a proprietăților compușilor volatili cât și din punct de vedere al originii și formării lor în plante.

Geneza compușilor aromatizanți, din *Allium*, poate fi considerată ca având două căi: una conține compușii formați prin distrugerea bulbului (majoritatea compușilor cu sulf) iar cea de a doua derivă din reacțiile secundare ce au loc (compușii carbonilici).

În figura 2.5 sunt prezentate căile principale de formare a principalilor compuși volatili care conțin sulf și totodată prezintă modul de comportare a (+)-S – metil- și S-(2-propenil)-L-cistein sulfoxidului similar cu comportarea derivatului (+)-S -propil.

Sub influența enzimei allinaza, acești trei compuși sunt descompuși pentru a forma acid piruvic și alchil(alchenil)tiosulfinați. Acești tiosulfinați au fost identificați și de Bennet (31).

Stoll și Seebeck (288) au sugerat prezența tiosulfinaților ca produși intermediari în aceste reacții enzimatică, având structura RSOH.

Dabritz și Virtanen (65) au propus un mecanism de reacție diferit, cu formarea, ca intermediar, a acidului 2-propilsulfenic, dar a cărei prezență nu a fost identificată. Această observație conduce la propunerea unui mecanism de reacție care implică o reacție bimoleculară între două molecule de substrat, care conduce la

formarea directă a tiosulfinaților. Din reacție pot rezulta și tiosulfinați micști (nesimetrice), chiar și prin condensarea a doi acizi sulfenici diferiți sau prin efectul catalitic al cisteinei asupra tiosulfinaților simetrici, acest ultim proces fiind ilustrat în literatura de specialitate (174,327).

Formarea tiosulfinaților micști poate decurge și direct din doi sulfoxizi diferiți ai cisteinei.

Reacția tiosulfinaților ce conțin grupări (-SH) biologic active constituie un factor principal al proprietăților fiziologice prezente la acești compuși, constituind principiile "active" atât ale *Allium Sativum* cât și ale lui *Allium Ceba* (161,288).

Tiosulfinații reprezintă compușii ce dau mirosul caracteristic, aceștia fiind destul de instabili putând disocia pentru a forma disulfuri și tiosulfonați.

Prezența di(1-propenil)disulfurilor, respectiv a monosulfurilor a fost identificată de Boelens și colaboratorii (40). Aceștia au identificat toți cei trei izomeri ai di(1-propenil)disulfurii (randament de 10%) obținuți prin încălzire 8 ore la 15°C, neexistând totuși date analitice concludente cu privire la aceștia.

2.2.5.1. DINAMICA BIOGENEZEI AROMEI

Din figura 2.5, reiese că nici un compus conținând oxigen, nu s-a obținut prin descompunerea termică (in vitro) a disulfurii de metil-(1-propenil) (40).

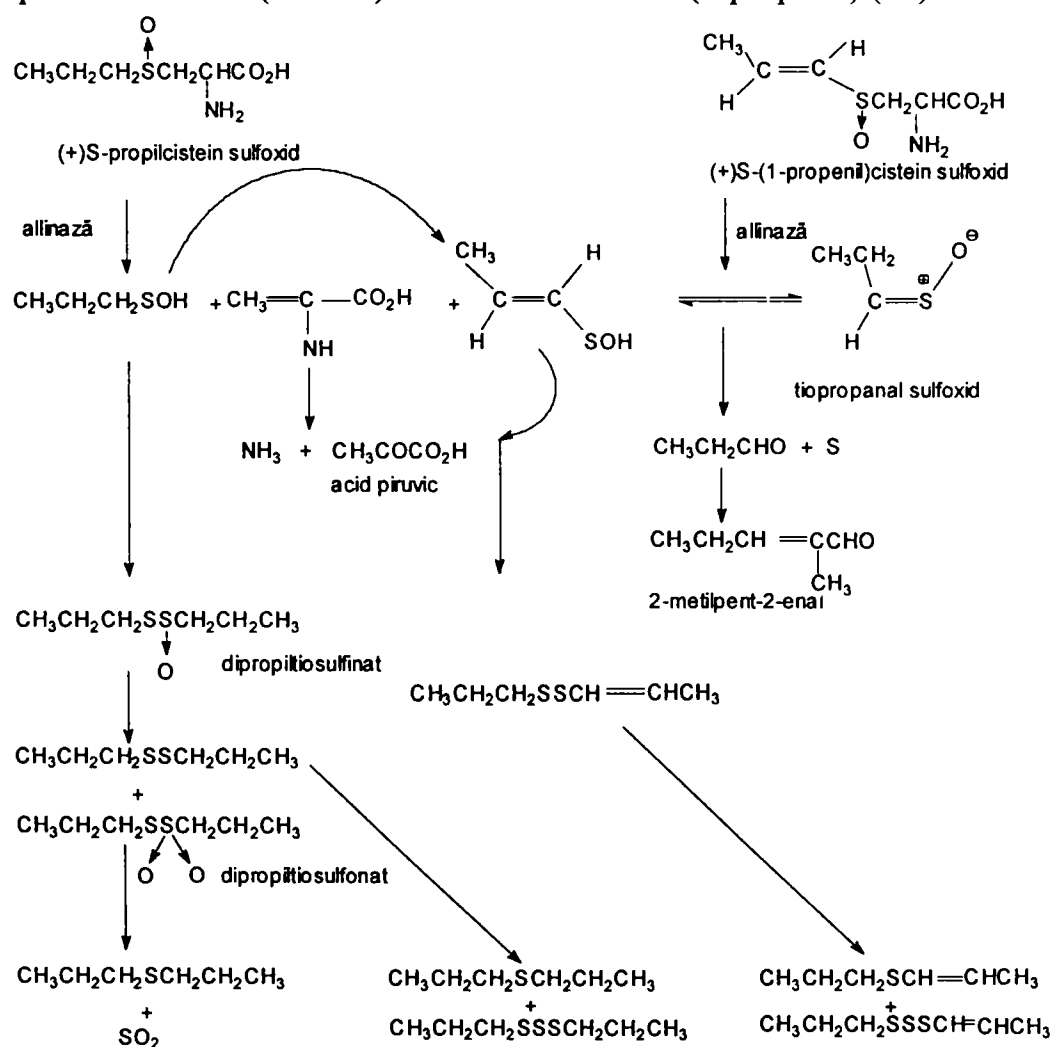


Fig. 2.5. Obținerea enzimatică a compușilor aromatizanți din precursori aromatizanți din *Allium*

Cei mai importanți compuși sunt: acetaldehida (care derivă de la acidul piruvic) și propanalul (care derivă din tiopropanal sulfoxid). În momentul distrugerii bulbului au fost identificați: acetaldehida, propanalul, 2-metil-pentanalul și 2-metil-2-pentanalul (primii trei fiind, în mod special, în cantitate mai mare).

Disulfura de dipropil a fost identificată în primele 15 minute de la distrugerea bulbului, după acest timp, începând să crească conținutul în compuși cu sulf, fiind prezenți de asemenea și compuși cu oxigen (chiar și după 60 minute) (154).

Concentrația compușilor cu oxigen este mai mare imediat după distrugerea bulbului proaspăt, decât în țesuturile supuse fierberii (acest fapt se datorează probabil distrugerii allinazei).

Mazza (187,188) a prezentat existența a 14 compuși aromatizați: 2,5 dimetiltiofen , disulfuri (dimetil-, dipropil-, di(2-propenil-)) și sulfuri, aldehide (acetaldehida, propanalul) , alcooli: (metanol, etanolul, 1-propanolul și 2-propanolul).

Din aceste lucrări se poate concluziona că randamentul de formare a compușilor aromatizați volatili, depinde atât de gradul de distrugere al țesutului vegetal cât și de timpul de incubare.

Schwimmer și Guadagni (266) au prezentat câteva metode de îmbunătățire a aromei din produsele deshidratate. Astfel ei au arătat că prin adăugarea de L-cisteină și alți compuși nevolatili conținând grupa SH se poate mări intensitatea aromei prin deshidratare. Ei arată că, în mod aparent ,allinaza nu este afectată de adăugarea de L-cisteină. Mai mult, se consideră că intră în reacție, prin gruparea SH cu disulfurile de metil, propil și 1-propil, cu tiosulfonații și tioalcanii. Mazza (187) consideră că influența cisteinei, respectiv creșterea intensității aromei, se datorează formării disulfurilor și totodată că această creștere este dependentă de timp; pe de altă parte, Yagami (327) a observat că acest efect de creștere a intensității aromei se datorează de fapt borohidririi de sodiu adăugată produselor de Allium; aceasta influențează reacția enzimatică de formare a intermediarilor (respectiv a tiosulfonaților) și anume îi reduce la produși volatili .

2.2.6.COMPUȘII VOLATILI DIN ALLIUM SATIVUM

Brodnitz și colaboratorii (43), printr-o metodă tipică de investigare a extractului omogen de Allium Sativum , în triclorflormetan, prin analiza IR și RMN au arătat că extractul crud este foarte bogat în di-(2-propenil)-tiosulfinat; acest compus nu a fost regăsit prin studiul gaz-cromatografic a uleiului.

În schimb, au fost detectate alte șase componente volatile(în concentrație mai mică de 20% din totalul de compuși volatili), care au fost identificate ca fiind: 2-propen-(1)-ol (5.4%), disulfură de metil(2.4%), trisulfură de metil-(2-propenil) (1.5%) și trisulfură de di-(2- propenil) (1.0%).

Cu ajutorul RMN și a spectrometriei de masă au fost identificați doi compuși care au fost considerați ca fiind în cantitatea cea mai mare (obținuți prin cromatografie de gaz) între compușii volatili; Aceștia sunt 3-vinil-, 1,2 -S-5-enă și 3-vinil-1,2-S-4-enă(55.4%)și derivă din tiosulfinatul de di-(2-propenil).

3 Vinil-1,2-S-4-enă a fost menținută timp de 20 de ore la 20°C, timp în care acest produs s-a descompus formându-se sulf, di-(2-propenil)-sulfura (14%), -disulfura (66%) și trisulfura (9%).

Dintr-un extract metanolic de Allium Sativum(15), s-a izolat trisulfura de 1,5-hexadienil-(2-propenil), considerând că sunt necesare studii ulterioare pentru stabilirea originii acestui compus.

Brodnitz (43) și-a continuat cercetările obținând alți componenți răspunzători de caracterul aromatic al extractului și anume: metantiol (31.6 mg/100g), 2-propen-1 tiol (388 mg/100g), 1-propantiol (2 mg/100g) și 2-propantiol (4.5mg/100g) arătând că este necesară o aprofundare a studiului compușilor aromatici volatili cu ajutorul cromatografiei de lichid de înaltă performanță.

2.2.7. EVALUAREA INTENSITĂȚII AROMEI ÎN SPECIILE DE ALLIUM

Evaluarea intensității aromei se face ținând cont de compoziții răspunzătoare de acest fapt și anume de disulfuri, trisulfuri, tiosulfuri și tiosulfonați. Intensitatea aromei acestora este diminuată de prezența compușilor carbonilici și alcoolici.

De asemenea, intensitatea variază în funcție de tipul de cultură, de maturitatea plantei, condițiile de stocare după recoltare, de condițiile agronomice și ale mediului pe timpul creșterii și de condițiile de prelucrare.

În vederea evaluării intensității aromei în această specie, au fost propuse metode chimice tipice pentru fiecare categorie de substanțe. Astfel tiosulfonații au fost determinați utilizând cromatografia în strat subțire; tiamina și cisteina prin fotocolorimetrie; principiile lacrimatorii, (108, 111) prin cromatografie în strat subțire, de gaz și fotocolorimetrie (absorbție la 254nm) (23,108).

În afară de metodele arătate mai sus, au fost utilizate o serie de tehnici de analiză pentru măsurarea conținutului de substanțe volatile cu conținut de sulf (61,98,241).

Metoda, cuprinsă în Standardele Internaționale, pentru determinarea compușilor volatili cu sulf din *Allium Cepa* și *Allium Sativum*, include macerarea în apă a țesutului vegetal, adaosul de etanol, distilarea compușilor volatili cu sulf și titrarea argentometrică a distilatului.

Abraham și colaboratorii (4) determină conținutul de substanțe volatile cu sulf prin metoda oxidării distilatului cu cloramină T.

Determinarea conținutului în acid piruvic, produs primar al degradării enzimatice a sulfoxidului alchilcisteinei sub acțiunea allinazei, a fost utilizată intens, ca o măsură a caracterului aromatizant.

Freeman și Mc Breen (108) au arătat că există o bună corelare între cantitatea determinată de tiosulfinați și concentrația de acid piruvic și aplicarea metodei la analiza tiosulfinaților în *Allium* crud, deshidratat prin congelare respectiv deshidratat prin încălzire.

Relativ recent, au fost izolați din *Allium* sulfoxizii substituiți ai cisteinei, purificați prin electroforeză și separați prin cromatografie în strat subțire. Metoda a fost cuantificată, utilizând ca standard derivați butilici, vizualizarea obținându-se cu ninhidrină (159,160).

Metoda aceasta este cea mai indicată pentru evaluarea și analiza sulfoxizilor S-alchil (alchenil)-L-cisteinei în specia *Allium*, pe țesuturile plantei, pe măsura maturizării plantei.

2.2.8.FACTORII CARE AFECTEAZĂ COMPOZIȚIA CHIMICĂ A SPECIEI ALLIUM

Efecte botanice, de cultură și de dezvoltare

În literatură (109) sunt demonstrate diferențele, calitative și cantitative, ce apar în compoziția uleiurilor volatile ale acestei specii precum și faptul că conținutul total în substanțe volatile cu sulf, crește pe măsura maturizării plantelor.

Pentru studierea detaliată a distribuției compușilor volatili în *Allium* s-au utilizat atât cromatografia de gaz, cât și analizele chimice cantitative și calitative a tiosulfonaților, acidului piruvic și a sulfului A fost studiată compoziția în diferite părți ale plantei, cultivate pe terenuri diferite.

S-a constatat că există deosebiri între intensitatea aromei (exprimată în μM tiosulfinați/gram greutate crudă) din frunze și cea din bulbi, în timp ce în rădăcini și semințe concentrația este asemănătoare cu cea din frunze.

În *Allium Sativum*, mai mult de 90% din compușii răspunzători de aromă sunt stocați în frunze.

Beker și Schuphan (31) au studiat localizarea allinazei și a celulelor purtătoare de uleiuri volatile din *Allium Cepa*. Utilizând tehnici autoradiografice și histologice, autorii au concluzionat că în timp ce allinaza este distribuită în toată planta, celulele ce conțin uleiurile volatile sunt concentrate în învelișul vascularizat al semințelor.

Freeman și Mossadeghi (109) au utilizat culturi, atât pe nisip cât și în soluție pentru a investiga relația între compușii volatili aromatizați și adaosul de sulfați în cadrul speciei *Allium*. Plantele au fost cultivate în condiții în care a fost aplicat un adaos de sulfați de 0 - 3 moli echivalenți/1. S-a constatat o scădere a concentrației uleiurilor volatile, scădere care a fost pusă pe seama descompunerii sulfoxidului trans (+)-S-(1-propenil)-L-cisteină. De asemenea se observă și o scădere a cantității de acid piruvic și substanțelor volatile cu sulf (măsurători efectuate pe cromatograf cu gaz), sugerând că deși sulfații influențează scăderea compușilor volatili cu sulf, aceștia nu constituie un impediment în dezvoltarea normală a plantei, deci nu conduc la o modificare a metabolismului plantei.

Influența regimului de hidratare asupra speciei *Allium* a fost studiată de Platenius (242). S-a constatat, pe lângă o diminuare a dezvoltării, în condițiile ploii naturale, o creștere a concentrației compușilor aromatizați. Acest fenomen a fost studiat și explicat de Freeman și Mosadeghi (109), prin faptul că se produce un stress asupra plantei ceea ce conduce la o acumulare a metaboliților de concentrații scăzute cum ar fi aminoacizii, care în acest fel devin accesibili pentru transformarea lor în precursori aromatizați.

Efecte similare, de stress hidric și influență a sulfaților, au fost observate la legume și condimente, toate cu conținut bogat în sulf.

Freeman citează câteva lucrări care prezintă modificări considerabile în componenții aromatizați în primele 20 de zile după germinare, după acest termen nu mai există modificări evidente.

Recent Malkki și colaboratorii (176) au arătat că după formarea bulbului apare o scădere a concentrației acidului piruvic. O concentrație mare a sulfoxizilor de S-propil-S-(1-propenil) și S-metil-L-cisteină a fost observată înaintea formării bulbului (3.6 mg/g crud).

Depozitare și prelucrare

În toate cazurile de depozitare (4 la 8 luni), Platenius (242) a observat o creștere a conținutului în substanțe volatile cu sulf.

Astfel, după primele cinci luni de la începerea experimentului s-a observat o creștere a acestor compuși cu 25%.

De asemenea s-a observat o scădere bruscă după o perioadă de 190-200 zile, a acidului piruvic, a principiilor lacrimatorii și a substanțelor volatile totale, totuși aceștia se găsesc în concentrație ceva mai mare decât la începutul experimentului.

S-a tras concluzia că precursorii aromatizanți, sunt utilizați ca sursă de azot necesar dezvoltării plantei și măresc activitatea metabolică din plantă.

Această creștere a compușilor volatili cu sulf a fost explicată de diferiți autori, ca fiind un rezultat al degradării enzimice a γ -glutamil peptidelor.

Atât Bernhard (32) cât și Freeman și Whenham (106) au arătat că în timpul prelucrărilor, plantele suferă pierderi mai mari de 90% din compușii aromatizanți, în special prin deshidratare. Pierderile care au fost observate sunt de 89% în dimetilsulfură; 98% în metildisulfură, disulfură de dipropil(99.8%) și la disulfură de 1-propenil-propil (99.4%).

Analizele chimice au arătat că de fapt toate tipurile de prelucrare, cum ar fi: pasteurizarea, fierberea, deshidratarea, congelarea și conservarea decurg cu pierderi mari în ceea ce privește compușii aromatizanți.

Pentru înțelegerea completă a mecanismului pierderii substanțelor aromatizante, Freeman și Whenham (109) au determinat atât concentrația allinazei cât și a substratului (prin măsurarea cantității de acid piruvic) în timpul prelucrării plantelor.

Nivelurile concentrației enzimei, respectiv a substratului, sunt de 45% și 75% (față de planta crudă) la planta congelată și uscată ; 10% și 19% la planta supusă uscării cu aer cald; 6% și 46% la planta supusă congelării și 5% și 73% la fierbere.

Prin adăugarea de allinază exogenă la planta procesată (în special în cazul congelării și fierberii), este de așteptat o îmbunătățire a calității substanțelor aromatizante, ceea ce nu se întâmplă însă practic. Aceasta duce la concluzia că procesarea afectează fiecare substanță în mod individual.

Mazza (188) și Le Magner precum și Schwimmer (265) au arătat că în cazul rehidratării plantei uscate cu soluție de cisteină, preferabilă apei, se obține o creștere a intensității aromelor de 20 de ori. Același efect a fost observat și în cazul în care au fost utilizați alți mercaptani nevolatili, spre deosebire de acțiunea acidului ascorbic care nu a avut nici un efect.

Mumtaz și colaboratorii (203) au arătat că mirosul puternic (estimat prin măsurarea substanțelor volatile de tip reducător) este puțin afectat de γ -iradiere sau depozitare. Gamma iradierea (70-150Gy) ,utilizată în mod obișnuit pentru prevenirea dezvoltării ciupercilor, s-a dovedit că provoacă scăderea activității cistein sulfoxidului C-S liazei (190).

După 12 săptămâni de stocare la temperatura camerei, activitatea enzimei s-a refăcut. De asemenea s-a constatat că prin γ -iradiere se reduce formarea disulfurii de dipropil.

Cercetătorii japonezi (213-215) au efectuat studii asupra naturii și produșilor γ -radiolizei soluțiilor apoase de aminoacizi cu sulf, concluzionând că pierderea proprietăților lacrimatorii (asociat cu pierderea mirosului puternic) în plantele iradiate se datorează mai degrabă distrugerii enzimei allinază decât descompunerii substratului.

Mathur (181) a observat că γ -iradierea și depozitarea (7 luni) usturoiului nu are efect asupra compușilor volatili, a mirosului sau a țesuturilor vegetale. Curzio și Ceci (62) au examinat efectul γ -iradierii (50Gy) asupra compoziției extractului eteric de usturoi, dar Kwon a sesizat apariția unor modificări a aromei de *Allium sativum* în urma iradierii bulbilor (158).

Rezultatele analizelor prin cromatografie de gaz și spectrofotometrice au arătat că nu există diferențe apreciable între bulbi de usturoi depozitați 180 de zile sau la cei γ -iradiați.

2-Propenil sulfitul nu a mai fost detectat dacă bulbi au fost menținuți la temperatură mai mare de 50°C, timp de 8 ore. De asemenea di-(2-propenil)-tiosulfatul se descompune la o temperatură mai mare de 60°C. O deteriorare sensibilă a substanțelor aromatizante a avut loc prin menținerea timp de 8 ore la temperatura de 60°C.

Utilizarea acidului ascorbic și a SO₂, ca stabilizanți ai culorii plantei de *Allium Sativum*, în timpul deshidratării, a fost studiată de Pruti J. S. și Singh L. J. (246). În timp ce acidul ascorbic nu a avut nici o influență asupra culorii sau a substanțelor aromatizante, mecanismul acestor influențe nu a fost pe deplin elucidat. Se presupune că nu este afectată enzima ci precursorii compușilor aromatizanți. Tratarea cu SO₂ influențează negativ, în special, activitatea antimicrobiană a plantei de *Allium Sativum* deshidratat.

Adaosul de allinază exogenă mărește cantitatea de 2-propenil tiosulfat de cinci ori, iar de 2-propenil disulfură de două ori, ceea ce indică faptul că prin fierbere nu sunt descompuși precursorii aromatizanți și nici compușii cu activitate antibacterială.

Deteriorarea aromei, este maximă la *Allium Sativum* pudră, la 37°C și minimă la 0-2°C.

Analizele gaz cromatografice ale plantei crude și ale celei depozitate (6 la 12 luni) denotă o creștere considerabilă a componetelor volatile influențând în acest mod proprietățile organoleptice.

2.3.ENZIMA CHEIE - ALLINAZA

Lancaster (159) și colaboratorii au identificat un număr mare de aminoacizi neproteici ca metaboliți secundari în plantele superioare.

În unele cazuri, aminoacizi specifici sunt constituenți caracteristici ai unor specii anumite, fiind utilizați ca marcheri. Astfel S-alchil cistein sulfoxidul este constituentul a unui număr mare de specii printre care se găsește și *Allium Sativum*. Am arătat anterior că majoritatea componentilor aromatici caracteristici ai acestor plante, derivă în urma degradării enzimaticice cu o C-S-liază prezentă în plante. Această enzimă a fost separată din substratul ei natural în momentul distrugerii țesuturilor plantei (159).

Enzima prezentă în bulbi de *Allium Sativum* a fost descrisă pentru prima oară de Stoll și Seebeck (289). Ei au arătat că principalul substrat, asupra căruia acționează enzima, este aliina (S-alil-L-cistein sulfoxidul). Acest substrat, sub acțiunea enzimei, dă naștere la acid piruvic și amoniac.

Acidul alilsulfenic și acidul α -aminoacrilic se formează ca intermediar în timpul degradării enzimaticice; în același timp apare și un miros caracteristic ceea ce denotă apariția alicinei.

Enzima obținută de Stoll și Seebeck, cu o puritate neprecizată, a fost activă la pH cuprins între 5-8 și o temperatură de 37°C.

Goryachenkova (122) și mai târziu, Mazelis și Crews (185) au demonstrat stimularea enzimei de prezența piridoxal fosfatului precum și faptul că se poate obține o enzimă de șase ori mai pură, prin precipitarea cu sulfat de amoniu, urmată de o fracționare pe Sephadex G-200, confirmând observațiile lui Stoll și Seebeck.

Enzima purificată are activitate optimă la un pH de 6.5 pentru un substrat de S-metil-L-cistein sulfoxid.

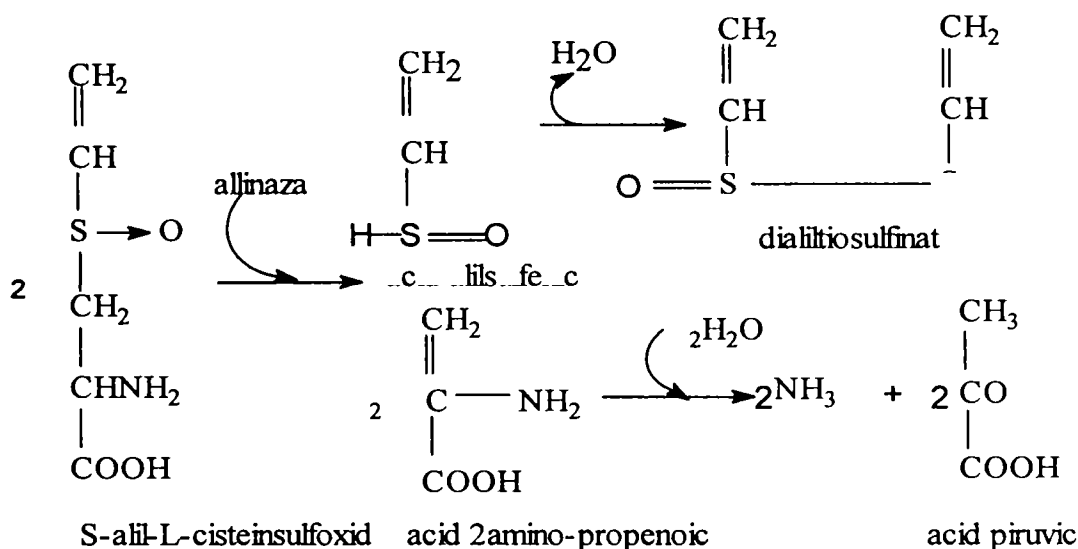
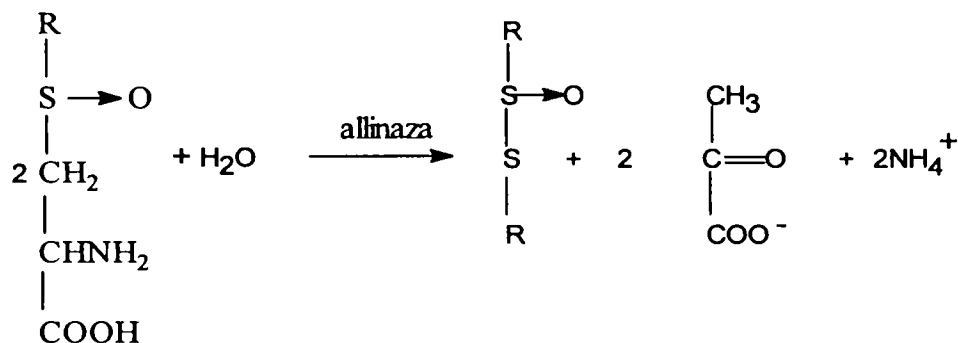
Pentru diferiți sulfoxizi ai S-alchil-Lcisteinei utilizați ca substrat, au fost determinate următoarele valori ale constantei Michaelis (Km):

S-alchil(alchil)-L-cistein sulfoxidul	V _{max} unit/mg proteină	K _m mM
S-metil-L-cistein sulfoxidul	76	15
S-propil-L-cistein sulfoxidul	123	6
S-amil-L-cistein sulfoxidul	86	6
S-propil-L-cistein sulfoxidul	30	3
S-butil-L-cistein sulfoxidul	50	5

Enzima este stimulată de prezența EDTA și a ionilor de Mg, Mn, Co sau Fe și este inhibată de adaosul de cisteină sau hidroxilamină (ultima fiind caracteristică pentru enzimele activate de prezența piridoxalfosfatului) S-substituenții cisteinei, corespunzând substratelor prezentate anterior, constituie inhibitori competitivi.

Mazelis și Nock (186,216, 217) au utilizat pentru purificarea allinazei sulfat de amoniu (saturație 35%) și dializa, în prezența tamponului fosfat de Na și de K și a piridoxal 5 fosfatului. Separarea a fost efectuată pe o coloană cu Concanavalin A - Sepharose 4B. Proteina inactivă a fost eluată cu soluția tampon de fosfat de Na și K.

Reacțiile principale care are loc sunt:



Determinarea proteinelor a fost făcută conform teoriei lui Lowry (172), utilizând ca standard ovalbumina. Frațiunile proteice au fost analizate electroforetic utilizând ca sistem tampon soluții de dodecil sulfat de sodiu (SDS)/uree. Gelurile fiind preparate conform metodei lui Hames (129) iar proteinele au fost vizualizate cu Comassie blue (129).

Constanta lui Michaelis (K_m) a fost determinată utilizând metoda lactat dehidrogenazei descrisă de Schwimmer și Michaelis (264). Utilizând ca substrat S-etil-L-cistein sulfoxidul s-a obținut o valoare pentru K_m de 5.7 mM, valoare care coincide cu cea obținută pentru enzima nepurificată superior. Pentru substratul de S-alil-L-cisteinsulfoxid s-a obținut o valoare a K_m de 3.3 mM. Această valoare este mai mare decât cea raportată de Kazaryan și Goryachenkova ($K_m=0.5$ mM)(122). O explicație asupra diferenței mari dintre aceste două valori ar fi faptul că Goryachenkova a utilizat diastereoizomerul natural al allinazei și nu amestecul obținut prin sinteză, utilizat de Mazelis și colaboratorii(186).

Determinarea greutății moleculare a allinazei și a subunităților ei a fost făcută prin gel filtrare pe o coloană de BIOGEL A 0.5mM echilibrată cu o soluție tampon. Coloana a fost standardizată utilizând tiroglobulină bovină, gamma globulină, ovalbumină, mioglobină și vitamina B₁₂.

Subunitățile au fost determinate după un tratament prealabil al enzimei cu uree 6M la 65°C timp de 45 de minute, pe coloană echilibrată cu soluție tampon conținând uree 6M. Ca proteine standard au fost utilizate Dextran Blue, gamma globulină, albumină serică, ovalbumină și mioglobină.

Astfel, greutatea moleculară a enzimei a fost estimată la 85000 prin cromatografierea fracțiunii VI, purificate pe BIOGEL A 0.5mM. Pentru holoenzimă, Kazarian și Goryachenkova (122) au determinat o masă moleculară de 130000 respectiv pentru o subunitate, de 65000. Diferențele acestea între masele moleculare nu au putut fi explicate. Unul din motive ar fi existența posibilității de interacțiune între enzimă (care este o glicoproteină) și Sephadex G-150.

Analiza carbonaților a fost efectuată prin metoda dată de de Dubois și colaboratorii care utilizează acidul fenolsulfhidric (85). Ca standard a fost utilizată glucoza. Pentru enzima analizată s-a determinat un conținut de 5.5% în greutate de glucide. Această valoare este foarte aproape de cea dată de Tobkin și Mazelis (299), de 5.8%. Aceste glucide cuprind hexozamină 1.5% și metilpentoză 0.5%. Nu a fost identificată prezența acidului sialic.

Analiza aminoacizilor s-a efectuat pe un hidrolizat proteic obținut prin încălzirea unor probe de extract de *Allium sativum* în HCl 6N, timp de 24 ore la o temperatură de 110°C și apoi separarea acestora pe un analizator de aminoacizi de tip Beckmann Model 6300, de către Moore S. și Stein (198). O neconcordanță de valori a existat la determinarea cantitativă a triptofanului; au fost utilizate: metoda lui Tobkin și Mazelis și procedeul dat de Edelchoch (87).

S-a dovedit că concentrația în unii aminoacizi a allinazei din *Allium cepa* este de două ori mai mică decât cea din *Allium sativum*.

Compoziția în aminoacizi ai allinazei din *Allium sativum* este prezentată în tabelul 2.5.

Determinarea influenței piridoxal fosfatului a fost efectuată prin metoda lui Wada și Snell (314). Această determinare a fost efectuată atât pe enzima nepurificată, care s-a dovedit că este stimulată de prezența piridoxalfosfatului, cât și pe enzima purificată. Enzima purificată, în absența coenzimei, absoarbe la $\lambda=430\text{nm}$.

În prezența coenzimei, lungimea de undă la care absoarbe enzima este de 410nm, la o concentrație a coenzimei de 2.97 mM, determinându-se în acest fel că 2.17 moli de coenzimă sunt legați la un mol de enzimă.

Aceste observații sunt în concordanță cu determinările efectuate anterior prin metode chimice.

În prezența L-cisteinei, piridoxalfosfatul formează un compus tiazolidinic, care absoarbe la 330nm (nu mai apare maximul de la 430nm).

Un argument suplimentar pentru structura dimeră a enzimei, îl constituie faptul că doi moli de piridoxalfosfat revin la un mol de enzimă.

Specificitatea allinazei a fost demonstrată prin utilizarea mai multor tipuri de substanțe și anume: allină naturală, allină sintetică, S alil-D,L-cisteinsulfoxidul. Activitatea enzimei a fost determinată prin măsurarea cantității de acid piruvic format în urma reacției enzimaticе. Determinarea cantității de acid piruvic s-a făcut cu ajutorul reacției cu 2,4 dinitrofenilhidrazina.

Concluziile care au rezultat, au fost că allinaza nu acționează decât asupra compusului natural derivat de (+)-L-cisteină; nu reacționează asupra derivaților (-)-L-cisteinei.

(-)-S-alil-L-cisteinsulfoxidul este scindat de către allinază, dar într-un timp mult mai îndelungat față de acțiunea asupra (+)-S-alil-L-cistein sulfoxidului. Pe de altă parte, nici (+)-S-alil-D,L-cisteinsulfoxidul și nici (+)-S-alil-D-cisteinsulfoxidul nu constituie substraturi pentru allinază (290).

În tabelul 2.6 sunt prezentate proprietățile enzimei allinaza izolată din *Allium sativum*, în comparație cu cea izolată din *Allium cepa*.

Compoziția în aminoacizi a *Allium Sativum* și *Allium Ceba* (112, 152)

Tabelul 2. 5.

Aminoacizi	<i>Allium Sativum</i>		<i>Allium Ceba</i>
	mg/100 g	%	
Alanină	0.47	10.3	9
Isoleucină	0.27	5.9	6.3
Serină	0.30	6.6	6.6
Valină	0.45	9.9	12.1
Leucină	0.17	3.7	2.7
Glicină	0.28	6.4	7.4
Albamină	0.27	6.2	7.4
Valină	0.26	5.7	6.7
Cisteină	0.07	1.5	0.8
Metionină	0.10	2.2	2.4
Izoleucină	0.137	3.0	4.9
Leucină	0.28	6.3	7.4
Izoleucină	0.23	5.1	4.9
Alanină	0.18	4.0	4.4
Leucină	0.30	6,6	7,4
Istidină	0.08	1.7	1.9
Arginină	0.20	4.4	3.4
Triptofan	0.48	10.6	5,6

Proprietățile allinazei izolată din *Allium Sativum* și *Allium Ceba* (290)

Tabelul 2.6.

Proprietăți	<i>Allium Sativum</i>	<i>Allium Ceba</i>
pH optim	7.4 - 8.6 (dep. de sol. tampon)	6.5
Substrat	L cisteinsulfoxid S substituit (alchil, alchenil, aril)	L cisteinsulfoxid S substituit (alchil, alchenil)
Activator	piridoxalfosfat	piridoxalfosfat
Inhibitor	hidroxilamina	hidroxilamina cisteină
Inhibitor competitiv	cisteina S substituită coresp. sulfoxid de metionină metionin sulfoximă	cisteina S substituită coresp.
Valori Km	16.6 (metil) 5.7 (etil) 3.8 (propil) 4.7(butil)	15 (metil) 6 (etil) 3 (propil) 6 (butil)

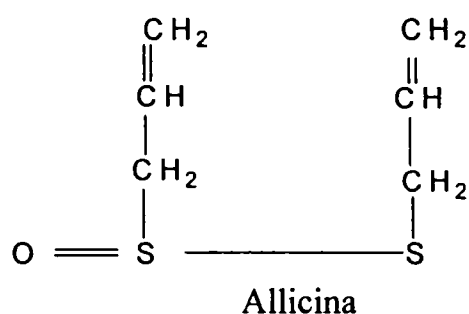
2.4.ALLICINA, PRINCIPIUL ACTIV AL ALLIUM SATIVUM

Primele investigații au fost efectuate asupra extractelor de plante, privind acțiunea lor antibacteriană, de către Cavalitto J. și Bailey J.H. în anul 1944, care au demonstrat că o infuzie proaspătă de bulbi de *Allium sativum* prezintă acțiune bactericidă. Anterior, mulți dintre cercetători au atribuit această activitate dialildisulfurii, acroleinei sau unei aldehide nesaturate similare și apoi unui grup de substanțe definite ca fitoncide.

După testarea, atât a dialildisulfurilor, cât și a dialilpolisulfurilor s-a constatat că acestea nu prezintă activitate bactericidă. S-a urmărit și efectul dialildisulfurilor sintetice; acestea au prezentat același efect.

Fitoncidele amintite mai sus, s-au dovedit a fi mult mai instabile decât allicina, care a fost obținută numai din speciile de *Allium sativum* (50).

Allicina se obține din alliină prin acțiunea allinazei, având următoarea structură:



Allicina a fost izolată în stare pură, de Cavalitto (50), sub forma unui lichid incolor, prin extracția bulbului de *Allium sativum* în alcool de 95%. Extractul obținut s-a concentrat sub presiune redusă (15-20 mm) până la îndepărtarea, aproape completă, a alcoolului. Produsul pur a fost izolat prin extracții repetate. Analiza elementală a avut următoarele rezultate: C 44.12 - 44.59; H 6.30 - 6.34; S 39.69 - 40.90% ceea ce corespunde formulei: $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{OS}_2$ și unei mase moleculare de 162; este solubil în apă la o temperatură de 10°C, într-un procent de 2.5%; este miscibil cu alcoolii, benzenul și eterii; are densitatea de $d_{20} = 1.112$ și un indice de refracție (la 20°C) $n_D = 1.56$ (130,137,143).

Produsul pur este iritant pe piele și are un miros caracteristic, mai puternic decât usturoiul.

Soluțiile apoase de allicină au un pH aproximativ de 6.5 iar la o depozitare timp mai îndelungat, formează un precipitat uleios, crescând în același timp și aciditatea soluției, prin formarea de cantități mici de bioxid de sulf, în același timp scăzând activitatea biologică soluției.

Adiția de alcalii duce la inactivarea imediată, cu precipitarea disulfurii de alil și formarea unei sulfuri a metalului respectiv.

Allicina a fost studiată din punct de vedere bactericid, în paralel cu penicilina, fiind conținută în infuzii de *Allium sativum*. Aceste infuzii și-au dovedit instabilitatea la încălzire, stabilitatea considerabilă la rece și inactivarea instantanee prin tratarea cu alcalii (144,207,288).

Acizii diluați nu au prezentat nici un efect asupra infuziilor.

Activitatea allicinei s-a dovedit a fi mai mult bacteriostatică decât bactericidă, atât asupra bacteriilor gram pozitive cât și a celor gram negative (asupra ultimelor, penicilina nu are efect)(12).

În tabelul 2.7 este prezentată activitatea bactericidă a allicinei după Cavalitto și Bailey (50).

Activitatea bactericidă a allicinei

Tabelul 2.7

Organism	Diluții		
	1: 85.10 ³	1: 125.10 ³	1: 250.10 ³
Stafilococcus aur.	0	0	-
Streptococcus hem.	0	-	-
Streptococcus virid.	0	0	-
B. subtilis	0	0	-
B. tifosus	0	0	-
B. paratifosu A	0	0	-
B. paratifosus B	0	0	-
B. morgani	0	0	-
B. eutiridilis	0	0	-
B. dishinterie Shiga	0	0	-
B. desinteris Flexner	0	0	-
V. cholaere	0	0	-
0 = absență	0	0	-
- = prezență	0	0	-

În afară de efectul bactericid și bacteriostatic, alt efect al *Allium sativum* este cel de micșorare a nivelului lipidelor, pe perioadă îndelungată.

Mathew P. și Augusti T.(179) au studiat mecanismul de acțiune al allicinei asupra lipidelor, ajungând la concluzia că administrarea zilnică de *Allium sativum*, la bolnavii cu hipercolesterolemie duce la o scădere considerabilă a colesterolului (după o perioadă de două luni). Rezultatele obținute au arătat o scădere considerabilă a lipidelor, atât în ser, cât și în ficat, acest efect datorându-se scăderii nivelului trigliceridelor și a colesterolului liber.

Această scădere s-ar putea explica prin faptul că biosinteza trigliceridelor și a fosfolipidelor este dependentă de existența a D-1,2-digliceridelor, biosinteza având loc în ficat cu participarea coenzimei A(162, 212, 274).

Allicina, prin structura sa, are posibilitatea de a se combina cu gruparea SH activă a coenzimei A, aceasta constituind de fapt placa turnantă în biosinteza acizilor grași, a colesterolului, trigliceridelor, precum și a fosfolipidelor(288). În acest fel, efectul de scădere a nivelului lipidic, poate fi atribuit capacității allicinei de a inactiva grupările SH existente(7, 22, 180, 193, 329).

Efectul micșorării nivelului colesterolemiei, este mai pronunțat asupra colesterolului liber decât asupra celui total (271). Acest studiu constituie și o explicație a faptului că extractul de *Allium Sativum* este utilizat în tratamentul bolilor cardiace și a aterosclerozei(89, 205, 231, 233).

Un alt efect benefic al plantei de *Allium sativum* este influența acestuia asupra dermatofităilor(311) și a drojdiilor(207, 235). Acest efect s-a dovedit a fi de zece ori mai mare decât asupra bacteriilor (16, 144).

Mai mulți autori au studiat efectul plantei *Allium sativum* asupra a patru tipuri de *Candida albicans* (244), *krusei*, *tropicalis* și *pseudotropicalis* prin metoda Oxford, pe mediu de malț-agar . Determinările au fost efectuate în paralel cu Nystatin. S-a observat că extractul de *Allium sativum* (cu un conținut de aproximativ 0.4% allicină) este mult mai eficace decât o soluție de allicină 5%(26, 41, 45, 72, 119). S-a determinat de asemenea efectul sinergic pe care *Allium sativum* le prezintă împreună cu amfotericina B asupra *cryptococcus neoformans* (274).

Rezultate bune s-au obținut și în prezența unor agenți oxidanți (apă oxigenată) care au mărit activitatea lui *Allium Sativum*, datorită conținutului în catalază a acestuia (20).

Focke și colaboratorii (106) au studiat, de asemenea, efectul allinazei și a allicinei asupra biosintezei acizilor grași în plante (90, 117).

Allicina inhibă acetilcoenzimaA sintetaza(100). Această enzimă duce la formarea acetilcoenzimei A din acetat, adenzinotriofosfat(ATP) și coenzimă A, prin eliberarea de acetil coenzimă A, adenzinomonofosfat(AMP) și pirofosfat. Rezultatele acestor autori au evidențiat și faptul că tiokinaza, este puțin afectată sau chiar deloc, și că posedă un mecanism de reacție diferit de cel al acetat tiokinazei (acetilcoenzimaA sintetaza) care este puternic influențată de allicină.

Aceiași autori au testat acetilcoenzimaA sintetaza în comparație cu alte enzime și au ajuns la concluzia că toate sistemele enzimaticе, care formează acetilcoenzimaA din acetat, sunt blocate de allicină. Sistemul bacterial, constând din acetatkinază și fosfotransacetilază, generează acetilfosfat (din acetat și ATP, formându-se ADP) și o a doua treaptă, de transfer a radicalului activat pe coenzima A (170, 193).

Transformarea acidului piruvic în acid gras, nu este inhibată de către allicină.

Yue-sheng Zhang și Xing-ruo Chen(331) au studiat efectul antimutagenic al *Allium sativum*, asupra lui *Escherichia coli* WP 2. Inducerea efectului mutagenic a fost efectuată cu 4 nitrochinolină 1 oxid(4NQO) și cu raze UV.

Efectul antimutagenic al plantei *Allium sativum* a fost observat numai în cazul tratării cu 4nitrochinolină, ceea ce duce la concluzia că extractul poate acționa prin inactivarea grupărilor electrofile a 4NQ sau prin inhibarea acțiunii sale metabolice.

Analiza acțiunii oncogenice indică prezența activității mutagenice ca fiind implicată în procesul de carcinogeneză (257, 259); autorii emit ipoteza că prin intervențiile în procesul acestor mutații, s-ar putea efectua un important pas în prevenirea cancerului.

Investigațiile epidemiologice au arătat corelarea între cantitatea de *Allium sativum* consumată în hrană și carcinomul gastric.

Cheng J. și colaboratorii au indus cancer de colon cu dimetilhidrazină(DMH) (doza zilnică administrată a fost de 20 mg/kg corp); s-a constatat că la indivizii cărora li s-a administrat *Allium sativum* în dieta zilnică, incidența cancerului de colon a fost mult diminuată (52).

A fost studiat efectul antitumoral al *Allium sativum* cultivat pe un sol îmbogățit în seleniu. Administrarea de *Allium sativum* a prezentat o puternică activitate chemopreventivă la șoarecii injectați cu dimetilbenzantracen (141, 142).

A fost de asemenea remarcat efectul de inhibitor tumoral al plantei *Allium sativum* în cazul cancerului oral la șoareci (283, 298).

Unele din componentele cu sulf ale plantei *Allium sativum* inhibă benzopirenul care induce neoplazia în stomacul de șoarece. Aceste observații au fost făcute de către Sparnius și colaboratorii în anul 1988,ei sugerând că *Allium sativum* ar putea conține substanțe care să prevină cancerul, studii ulterioare fiind însă necesare pentru

elucidarea multitudinii de mecanisme între substanțele active din *Allium Sativum*. Singh a arătat că acest efect anitumoral l-ar putea avea dialildisulfurile (276).

O serie de cercetători au pus în evidență existența unui alt efect deosebit de important pentru prevenirea bolilor coronariene, și anume efectul hipocolesterolemiant ceea ce va duce și la utilizarea acestei plante împotriva aterosclerozei(218, 232, 235, 270, 272, 333).

Un efect deosebit de important îl constituie efectul de antioxidant al componentelor din *Allium sativum*.

Se presupune că această plantă prezintă proprietatea de a înlătura radicalii liberi ai oxigenului care sunt implicați ca și factori cauzatori atât ai hipercolesterolemiei, ai aterosclerozei, ai aritmiei cât și ai infarctului ischemic indus. Mecanismul prin care acționează *Allium sativum* nu a fost încă stabilit, dar s-a dovedit că extractul de *Allium sativum* previne formarea de $\bullet\text{OH}$ indusă de malondialdehida din omogenatul de ficat de iepure. Această inhibare s-a dovedit a fi dependentă de concentrație(243, 244, 246).

Mc Cord (189) a arătat importanța existenței unei balanțe oxidare- antioxidantă pentru menținerea sistemului oxido reducător de apărare la un nivel optim de acțiune.

În anumite cantități, *Allium sativum* a dovedit că are un efect de reducere a agregării plachetare (200, 201, 206). Ali M. (11) a demonstrat că bulbul crud are un efect inhibitor asupra activității cicloxigenazei în țesuturile de iepure și anume un efect necompetitiv și ireversibil.; acesta ar putea fi utilizat eficient în prevenirea trombozei , deci în prevenirea accidentelor cardio-vasculare (67-69).

Roman Ramos (254) a arătat prezența efectului antihiperglicemiant al *Allium sativum* la iepuri . S-a dovedit un efect similar cu al medicamentelor uzuale.

Singh, S. a efectuat observații asupra modificărilor cromozomiale induse prin iradiere cu raze gamma și a efectuat și determinări biochimice pentru identificarea modificărilor în conținutul de grupări SH libere active precum și a activității glutathion-transferazei. S-a dovedit că animalele tratate anterior iradierii cu extract de *Allium sativum* au prezentat o scădere semnificativă atât a grupărilor SH cât și a activității enzimei (276, 278)

Allium sativum dovedește o serie de calități terapeutice dar a cărui mecanisme de acțiune nu se cunosc încă pe deplin, rămânând o direcție de cercetare extrem de variată întrucât oferă posibilități de remediu pentru numeroase boli extrem de frecvente în zilele noastre cum ar fi: hipercolesterolemia, hiperglicemia, bolile cardio-vasculare, precum și o serie de alte boli generate de stresul oxidativ producător de radicali liberi ai oxigenului.

Ținând cont atât de compoziția chimică extrem de complexă cât și de efectele benefice ale plantei *Allium sativum*, determinate până în prezent, obiectivele tezei de doctorat constau în următoarele:

- Studierea compoziției de bază a plantei *Allium sativum* indigen
- Obținerea unor extracte de *Allium sativum*
- Sintetizarea unor tiosulfinați, necesari pentru punerea în evidență a activității enzimei allinază
- Izolarea , determinarea masei moleculare a allinazei din planta *Allium sativum* indigen precum și determinarea influenței unor efectori asupra activității enzimei
- Testarea biologică a extractelor obținute în vederea determinării cantităților optime de *Allium sativum* ce trebuie administrate organismelor animale în vederea potențării răspunsului acestora la diferiți factori perturbatori (interni și externi)

PARTEA A II-A

CONTRIBUȚII PERSONALE

Aparatura utilizată în determinările experimentale:

- 1.Extracția prin disilare uscată s-a realizat cu ajutorul unui rotavapor ROTVAC Evaporator tip RVO-64
- 2.Punctele de topire s-au efectuat pe un aparat Boetius HMK 70/3193, DDR
- 3.Analiza elementală s-a efectuat la un aparat Elemental Analyzer Carlo Erba Model 1100
- 4.Determinările de spectru infraroșu s-au realizat în pastilă de KBr pe un aparat SPECORD M-80, Karl-Zeiss Jena
- 5.Determinările de spectroscopie RMN s-au realizat pe un aparat VARIAN-GEMINI-300, model 1992, operând la 300 MHz pentru proton
- 6.Determinările activității enzimei alinază și toate determinările de parametri biochimici s-au realizat pe un spectrofotometru în vizibil, SPECORD, Karl Zeiss Jena.
- 7.Determinările activității glutatone reductazei s-au realizat pe un spectrofotometru SPECORD UV-VIS, Karl Zeiss Jena
8. Determinările de rotații specifice s-au făcut pe un polarimetru POLAMAT la lungimea de undă a sodiului, 589.3 nm
- 9.Determinările de microelemente s-au realizat pe un spectrofotometru cu absorbție atomică AAS1-Karl Zeiss Jena, flacără de aer/acetilenă, lămpi specifice
- 10.Determinarea masei moleculare a enzimei alinaza s-a efectuat și cu ajutorul unui colector automat de fracțiuni de tip Labor Muszeripari Muvex (LMIM) iar pompa peristaltică utilizată a fost de tip LKB Bromma 10200 Perpex
- 11.Determinările modificărilor pe organe s-au efectuat cu ajutorul unui Microtom Romdidac
12. Determinările microscopice: lame de țesut și formulă leucocitară s-au realizat cu un microscop Amplival, Karl Zeiss Jena prevăzut cu un aparat de fotografiat Zenit.

Reactivii specifici utilizați:

- 1.Reactiv Bertrand I : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4% în apă distilată
- 2.Reactiv Bertrand II: 200g tartrat dublu de sodiu și potasiu și 250 g NaOH la 1 litru
- 3.Reactiv Carrez I: $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 15% în apă distilată
- 4.Reactiv Carrez II : soluție $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 23%
- 5.Reactiv Drabkin : 50mg KCN, 1g NaHCO_3 și 200 mg $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ se dizolvă în 1l apă distilată.
- 6.Reactiv May-Grunwald: eosinat de albastru de metilen în suspensie în alcool etilic și glicerină p.a.
7. Reactiv Giemsa- colorant bazic azur II și colorant neutru azur II-eosină, în suspensie în alcool etilic și glicerină p.a.
- 8.Reactiv Gornall: 45g tartrat dublu de sodiu și potasiu, 30g NaOH p.a., 15g CuSO_4 , 5g KI în 1l apă distilată
- 9.Mediu G.E.A.M.: 1% peptonă , 0.2% K_2HPO_4 ,2% agar soluție 2% în 100ml apă distilată
- 10.Mediu Levine: mediu G.E.A.M. la care se adaugă 2g%lactoză, 1.3ml% albastru de metilen soluție 0.5%, 2ml% eoyină soluție 2 %)
- 11.Mediu Sabouraud –bulion de carne
- 12.Mediu Mueller Hinton: geloză

Prescurtări utilizate:

- C.M.I.= concentrație minimă de inhibare
 C.M.B.=concentrație minimă bactericidă
 U.F.C.= unități formatoare de germeni

Hb= hemoglobină

MHb=methemoglobină

MHbr=methemoglobin reductaza

Glur= glutation reductaza

Cat= catalaza

ALAT= alanin aminotransferaza

ASAT= aspartat aminotransferaza

3.1. OBȚINEREA EXTRACTELOR DE ALLIUM SATIVUM

3.1.1. Considerații teoretice cu privire la obținerea extractelor din plante

Cei mai utilizați solvenți în prepararea extractelor sunt: apa, alcoolul de diferite concentrații, amestecuri de alcool și eter, amestecuri de alcool cu glicerină și apa, alcool propilic, alcool metilic, cloroform, benzină, eter de petrol, eter etilic precum și extracția în prezența substanțelor tensioactive, a unor emulgatori sau detergenți, etc. Alegerea solventului și a concentrației lui se face ținând seama de substanțele ce urmează a fi extrase, precum și de substanțele inerte care nu trebuie antrenate în soluție (140).

Ținându-se seama că în produsele vegetale, circulația tuturor substanțelor active se face în mediu apos, rezultă că extracția optimă a principiilor active s-ar realiza cu apă. În realitate situația este diferită. Produsul vegetal uscat nu trebuie comparat cu o substanță chimică deshidratată, ci trebuie considerată ca un produs complex, ținând seama de toate modificările care au loc în timpul uscării. Prin trecerea protoplasmei celulare din stare de sol în stare de gel, deși natura chimică în sine se modifică puțin, pot avea loc unele procese de coagulare ireversibilă datorită căldurii sau îmbătrânirii coloizilor, alături de unele reacții enzimatică și chimice. Concomitent cu moartea celulei, substanțele active dizolvate în sucul celular din vacuole, ajung în contact cu pereții celulari, cu care, după caz, pot forma combinații solubile sau insolubile (260).

Pe de altă parte, unele substanțe insolubile în apă, cum ar fi uleiurile volatile și componentele lor, rezinele, alcoolii superiori, vitaminele liposolubile, etc. sunt menținute în soluție, în suspensie sau sunt emulsionate cu ajutorul unor substanțe hidrofile de tipul emulgatorilor, al căror efect poate să înceteze după moartea celulei, astfel încât componentele respective să nu mai fie solubile în apă. Pectinele insolubile (protopectinele) la încălzire trec în pectine solubile (9).

Prin concentrarea conținutului celular are loc o micșorare a pH-ului acestuia, unele sisteme tampon sunt dereglate și substanțele stabile în condiții normale pot suferi modificări în condițiile nou create.

Deci, una din problemele importante ale procesului de extracție, este ca produsul vegetal să fie adus într-o stare cât mai apropiată de starea în care se afla inițial, când celula era vie și care să permită difuziunea și osmoza, implicit, dizolvarea substanțelor din celula vegetală.

S-a observat că celulele moarte își pierd puterea lor osmotică, dar totuși, când prin peretele celular pătrunde o cantitate de apă, puterea osmotică a celulei este restabilită într-o oarecare măsură.

Primii cercetători care au obținut un extract de *Allium sativum* au fost americanii Cavalitto și Bailey (50); aceștia au fost urmați de o serie de alți cercetători care au pus la punct diverse metode de extracție atât în mediu apos cât și în diverși solvenți.

Scopul urmărit în prezentul studiu a fost obținerea unor extracte în condiții cât mai facile din care să poată fi efectuate determinările ulterioare ale compoziției, cu menținerea cât mai riguroasă a componentilor răspunzători de efectele terapeutice.

Astfel s-a procedat la obținerea extractelor atât prin distilare uscată cât și în mediu apos.

Materialul vegetal studiat s-a procurat de pe piața locală.

3.1.2. Obținerea extractelor din *Allium sativum*

3.1.2.1. Obținerea extractelor de *Allium sativum* prin distilare uscată

Modul de lucru:

S-au luat în lucru 200g bulbi curățați de usturoi, pentru fiecare șarjă.

Materialul crud curățat a fost introdus în balonul de distilare care a fost racordat la un rotavapor.

Distilarea s-a efectuat fără solvenți; pe tot parcursul distilării ($\tau = 60$ minute) s-a barbotat un curent slab de CO_2 , pentru prevenirea oxidării produșilor de distilare.

S-au obținut în medie 110 ± 23 ml lichid uleios și 72 ± 15 g masă uscată.

S-a lucrat în diferite condiții de extracție (s-a modificat temperatura, timpul de extracție, vidul aplicat în sistem precum și gazul inert) pentru a identifica condițiile

optime de obținere a unui extract prin distilare uscată , cu efect maxim bactericid și bacteriostatic. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3.1.

Variația parametrilor de extracție prin distilare uscată

Tabelul 3.1

40	N ₂	25	60
40	CO ₂	25	120
60	CO ₂	25	120
80	N ₂	30	60
80	CO ₂	30	120
100	N ₂	20	120
100	CO ₂	20	240
120	CO ₂	20	240
180	N ₂	30	60
240	N ₂	30	60

3.1.2.2. Obținerea extractelor apoase de *Allium sativum*

Fiecare șarjă a constat în utilizarea a 400 g bulbi proaspăt curățați ; materialul vegetal proaspăt curățat , s-a mărunțit printr-un aparat de tip Warning. La bulbii curățați a fost adăugată soluție tampon fosfat Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ (pH =7.0) de 4°C , în raport de 2g bulb : 1v soluție tampon. Mărunțirea s-a efectuat în 2-3 etape, timp de maxim 1 minut, pentru a preveni încălzirea masei de macerat și astfel o eventuală pierdere în tiosulfinați.

Maceratul obținut s-a menținut la temperatura de 4 °C timp de 30 minute, după care a fost supus centrifugării la 4 °C timp de 30 minute la 3500 rot/ minut, într-o centrifugă Janetzky cu răcire. După centrifugare s-a separat supernatantul care s-a prezentat ca un lichid galben-deschis cu miros specific , puternic înțepător. Supernatantul s-a filtrat pe hârtie Wathman 1 , sterilizată în prealabil în etuvă. Acesta a fost împărțit în patru fracțiuni , și anume: prima fracțiune a fost introdusă imediat în congelator și păstrată până în momentul testării, cea de-a doua fracțiune a fost introdusă în frigider la temperatura de 4°C, a treia fracțiune a fost stabilizată cu glicerină anhidră (10% volum supernatant) și menținută în frigider la 4°C iar cea de-a patra fracțiune a fost menținută la temperatura camerei (20-22°C).

S-au obținut în medie 250 ± 32 ml extract.

Ulterior fracțiunile , din fiecare șarjă, au fost supuse determinărilor principalilor bioconstituenți și au fost testate din punct de vedere al menținerii cantității de tiosulfinați în funcție de condițiile de condiționare și de depozitare. Rezultatele sunt prezentate în tabelele 3.3-3.6, respectiv graficele 3.2-3.5.

3.1.2.3. Analiza compoziției extractelor de *Allium sativum*

S-a trecut la identificarea principalilor bioconstituenți din extractele obținute. Au fost determinați următorii constituenți: umiditatea și cenușa prin metoda gravimetrică, glucidele reducătoare prin metoda Bertrand, lipidele totale prin metoda extracției cu solvenți (Soxhlet) și proteinele totale , prin metoda microKjeldhal (260). Metodele utilizate sunt descrise în cele ce urmează .

Determinarea umidității materialului brut (bulbi proaspeți de Allium sativum).

Metoda se bazează pe determinarea pierderii în greutate a probei ce a fost uscată la temperatura de 105 °C. În cazul produselor vegetale cu un conținut mare de apă (legume, fructe) este necesară o uscare preliminară în curent de aer cald la 60°C. În continuare se execută uscarea la 150°C întocmai ca și la produsele cu un conținut redus de apă . Pe lângă apă se evaporă și cantități mici de substanțe volatile, acizi liberi volatili, etc.

Modul de lucru

Într-o fiolă de cântărire care a fost adusă la greutate constantă , s-au cântărit 3g de bulbi proaspeți de *Allium sativum*. Proba de analizat a fost în prealabil uscată la aer și măcinată fin. Fiola de cântărire cu proba s-a introdus într-o etuvă și s-a ținut la temperatura de 105 °C timp de 3 ore. Fiola, scoasă din etuvă, s-a acoperit cu capacul și s-a introdus într-un exicator pentru răcire și apoi s-a cântărit. Diferența între cele două cântăriri ale fiolei reprezintă cantitatea de apă higroscopică pe care o conține substanța de analizat.

Calculul umidității în procente (U%) se face cu formula:

$$U\% = \frac{g}{G} \times 100$$

Unde: $g = g_1 - g_2$

G = greutatea substanței de analizat , în grame

g_1 = greutatea fiolei cu materialul proaspăt cântărit

g_2 = greutatea fiolei cu material, după uscare

g = greutatea apei conținută în G g substanță

Substanța uscată % = $100 - U$

Determinarea cenușei brute

Cenușa brută este formată din componentele minerale existente în produsele vegetale din resturi de pământ, nisip cât și din altele ce se formează în timpul incinerării (particule de cărbune nears). Proporția de cenușă a țesutului vegetal este o mărime ce depinde nu numai de conținutul în elemente fixe al materiei vegetale ci și de condițiile în care se face incinerarea (ex. temperatura) (260).

Modul de lucru

Într-un creuzet de porțelan calcinat și tarat în prealabil s-au introdus 5g din materialul vegetal, cântărit la balanța analitică. Calcinarea creuzetului cu materialul vegetal s-a efectuat întâi cu ajutorul becului Bunsen, pe sită de azbest, iar apoi în cuptorul electric la temperatura de 500°C, până la obținerea unui reziduu alb cenușiu. Creuzetul a fost lăsat să se răcească în exicator și apoi s-a cântărit.

Calculul:

Conținutul în cenușă raportat la materialul vegetal uscat (C_1 %) s-a calculat după relația :

$$C_1 \% = C \frac{100}{100 - U}$$

unde : C_1 = conținutul procentual în cenușă al materialului uscat

C = conținutul procentual în cenușă al materialului cu umiditate U

U = umiditatea în %

Determinarea glucidelor

Determinarea glucidelor din produsele vegetale se face din materialul proaspăt recoltat, deoarece prin păstrare conținutul lor scade , datorită activității unor enzime. Pentru a putea fi determinate , glucidele trebuiesc extrase din țesuturile vegetale . În mod

obișnuit extragerea se realizează prin menținerea probei mărunțite, un anumit timp în apă fierbinte. Deoarece în extract se găsesc alături de glucide și alte substanțe ca protide , acizi organici sau pigmenți , este necesară îndepărtarea acestora prin operația numită defecare.

Defecarea se bazează pe proprietatea substanțelor care însoțesc glucidele de a da cu sărurile metalelor grele (plumb, mercur, fier, et.) precipitate greu solubile care pot fi apoi îndepărtate prin filtrare.

Când se urmărește determinarea glucidelor reducătoare, dozarea se face direct din soluția defecată.

Extractul defecat se tratează cu un exces de soluție alcalină cupro- tartrică (reactivul Bertrand I și II) , se încălzește la fierbere , după care are loc titrarea cu soluție de KMnO_4 0.1n.

Din volumul soluției de permanganat de potasiu utilizat la titrare se calculează conținutul în glucide reducătoare respectiv în glucoză , știind că la 1 ml soluție de permanganat 0.1 n corespund 6.36 mg Cu.

Modul de lucru

Într-un balon cotate de 250 ml s-au introdus aproximativ 5 g bulbi proaspeți mărunțiți (cântăriți cu precizie de 0.01g) peste care s-au adăugat 150 ml apă distilată. S-a agitat conținutul și s-a neutralizat aciditatea cu ajutorul Na_2CO_3 în prezența hârtiei indicatoare de pH (pH=7). Balonul s-a încălzit pe o baie de apă , la temperatura de 80° C timp de 30 minute. După răcirea balonului până la 25-30°C , s-au adăugat 6 ml soluție Carrez Iși II , s-a agitat și s-a lăsat în repaus.

Pentru a controla dacă precipitarea substanțelor balast a fost cantitativă, s-au filtrat 1-2 ml din lichid într-o eprubetă în care s-a mai adăugat o mică porțiune de soluție Carrez. În cazul în care nu s-a mai produs precipitat s-a considerat că defecarea a fost completă.

Conținutul eprubetei s-a trecut cantitativ înapoi în balonul de 250 ml s-a adus la semn cu apă distilată după care s-a filtrat conținutul printr-un filtru uscat. Filtratul trebuie să fie limpede și incolor. Dacă filtratul este colorat și tulbure , neutralizarea nu a fost corect efectuată și operațiile de pregătire s-au reluat.

Pentru determinarea glucidelor reducătoare , se utilizează direct această soluție iar pentru determinarea glucidelor totale , este necesară invertirea acestei soluții.

Determinarea glucidelor totale

Într-un balon cotat de 100 ml s-au introdus 50 ml din soluția filtrată utilizată la determinarea glucidelor reducătoare și s-a tratat cu 5 ml de acid clorhidric concentrat. Conținutul balonului s-a încălzit pe o baie de apă timp de 5 minute la temperatura de 67-70 ° C. Balonul s-a răcit apoi sub jet de apă, s-a neutralizat conținutul cu carbonat de sodiu , s-a complectat până la semn și s-a filtrat. În continuare s-a procedat ca și la determinarea glucidelor reducătoare.

Determinarea glucidelor direct reducătoare

Într-o fiolă conică Erlenmayer s-au introdus 20 ml din soluția filtrată , s-au adăugat 20 ml soluție Bertrand I și 20 ml soluție Bertrand II . S-a încălzit la fierbere exact 3 minute . S-a lăsat în repaus pentru depunerea precipitatului de oxid cupros (Cu_2O) și apoi s-a filtrat pe un creuzet filtrant nr.4 . Precipitatul s-a spălat în porțiuni cu apă distilată fierbinte până la reacția complet neutră față de hârtia de pH.

După îndepărtarea filtratului din vasul de trompă și s-a remontat creuzetul filtrant pe care se află precipitatul de oxid roșu cupros. Peste precipitat s-au adăugat 20 ml de sulfat feric.

Oxidul cupros trece în compusul cupric solubil având o colorație verde. Soluția din vasul de trompă s-a titrat cu o soluție de permanganat de potasiu 0.1 n până când soluția se colorează în roz persistent 30 de secunde.

Calculul:

La 1ml KMnO_4 0.1n corespund 6.357 mg Cu.

Pentru a determina cantitatea de glucoză corespunzătoare cantității de material analizat , s-a aplicat formula :

$$\% \text{ glucoză} = \frac{m_1 \times V}{10 v \times g}$$

unde m_1 = mg glucoză corespunzătoare la ml de KMnO_4 utilizați la titrare

V = volumul total de extract , în ml

v = cota parte luată pentru dozare din extractul V

g = masa probei în grame din care s-au obținut V ml extract

Raportată la substanța uscată , cantitatea de glucide reducătoare va fi :

$$\% \text{ glucide reducătoare} = \frac{m_1 \times V}{10 \times v \times g} \times \frac{100}{100 - U}$$

unde U = umiditatea substanței analizate

Determinarea lipidelor totale prin metoda Soxhlet

Extracția lipidelor se realizează cu aparatul Soxhlet utilizând ca solvent de extracție eterul de petrol. Prin extracție, alături de lipidele propriuzise se extrag și rășini , ceruri, uleiuri eterice, pigmenți , din care cauză produsul obținut după îndepărtarea solventului poartă denumirea de lipidă brută.

Modul de lucru:

În cartușul de extracție s-au cântărit la balanța analitică, 3 grame de produs vegetal fin mărunțit care a fost uscat în prealabil la 105°C . Cartușul cu substanță s-a introdus în extractorul aparatului. Balonul extractorului , cântărit în prealabil la balanța analitică, s-a atașat extractorului și s-a adăugat apoi eter de petrol în extractor, peste cartușul cu probă , până ce lichidul a depășit curba tubului de sifonare , apoi s-a adăugat încă puțin solvent în plus. Eterul sifonează și va trece din extractor în balon. S-a început încălzirea balonului pe o baie de apă.

Timpul necesar extracției a fost de 6 ore , necesar obținerii a 24 de sifonări.

După ultima sifonare, eterul a fost lăsat în balon . S-a demontat refrigerentul și s-a scos cartușul din extractor. După uscare, acesta a fost din nou cântărit la balanța analitică.

Eterul de petrol din balon a fost supus evaporării , pe fundul balonului rămânând grăsimea extrasă . Balonul a fost introdus în etuvă pentru uscare timp de 1 oră la temperatura de $100-105^\circ\text{C}$ apoi balonul a fost introdus în exicator iar după răcire acesta s-a cântărit din nou.

Calculul :

$$\text{Grăsimea brută} = \frac{100 \times (G_2 - G_1)}{G}$$

G = cantitatea de material luat în lucru

G_1 = greutatea balonului gol , după uscarea la greutate constantă

G_2 = greutatea balonului , după extracție și uscare în etuvă

Determinarea proteinelor brute prin metoda microKjeldhal

Prin proteine brute se înțelege totalitatea de substanțe cu azot dintr-un produs vegetal.

Azotul total se determină prin trecerea acestuia în sulfat de amoniu , după o prealabilă mineralizare a produsului vegetal în mediu de acid sulfuric și titrarea ulterioară a amoniacului degajat din reacție, prin titrare(260) .

Modul de lucru

S-a cântărit la balanța analitică 1 g bulbi de *Allium sativum* proaspăt curățiți pe care l-am introdus cantitativ într-un balon Kjeldhal de dezagregare , de 250 ml. S-au adăugat 0.5 g CuSO_4 și 0.5 g K_2SO_4 . Balonul a fost încălzit treptat , timp de 30 minute până când soluția s-a limpezit devenind transparentă. După limpezire, s-a continuat încălzirea timp de 1 oră pentru desăvârșirea reacțiilor. După răcire , soluția s-a diluat cu 50 ml apă distilată și s-a introdus în balonul de distilare. Peste produsul mineralizat s-au adăugat câteva picături de fenolftaleină și un vârf de spatulă de Zn. S-a adăugat treptat o soluție de NaOH 40% până la virajul fenolftaleinei în roz. După adaosul tuturor reactivilor s-a făcut legătura cu un refrigerent a cărui capăt inferior , a fost imersat într-o fiolă cu 25 ml de H_2SO_4 0.05n de factor cunoscut. Conținutul balonului a fost supus distilării timp de o oră , până la distilarea completă a amoniacului. Conținutul fiolei a fost titrat cu o soluție de NaOH 0.05n , în prezența fenolftaleinei, până la virajul indicatorului de la incolor la roz pal.

Calculul :

$$\% \text{ proteină brută} = \frac{(V - V_1) \times 0.014 \times 6.25 \times 100}{G}$$

Unde :

V = volumul soluției de NaOH 0.1n utilizat pentru neutralizarea probei martor

V_1 = volumul de soluție de NaOH 0.1n utilizat la titrarea probei de determinat

G = cantitatea de substanță în g , luată în lucru

6.25 = factorul de transformare pentru calculul proteinei brute

0.014 = cantitatea în g de azot ce corespunde la 1 ml H₂SO₄ 0.1n

Pentru cele două tipuri de extracte ca și pentru rezidiul uscat s-au efectuat aceleași determinări ca și pentru bulbul proaspăt. Rezultatele compoziției în bioconstituenți a celor două tipuri de extracte sunt prezentate în tabelul 3.3.

Determinarea tiosulfinaților prin metoda Nakata

Carson și Wong (48) au pus la punct în anul 1959 o metodă colorimetrică de determinare a tiosulfinaților cu N-etilmaleinimidă; această metodă a permis identificarea cantitativă a acestora și de a-i distinge net față de compușii disulfurici similari. Totuși metoda a prezentat dezavantajul instabilității în timp a culorii; în acest sens Nakata (210), în 1970, a reușit să înlăture acest dezavantaj prin adăugarea în mediul de reacție a acidului ascorbic, care stabilizează culoarea dând rezultate satisfăcătoare în determinarea tiosulfinaților, compuși de mare preponderență în plantele de *Allium sativum* și *Allium cepa*.

Acest procedeu a fost utilizat pentru determinarea tiosulfinaților din extractele de *Allium sativum* prezentate anterior.

În prealabil s-a realizat o curbă etalon pentru determinarea tiosulfinaților, urmând următorul mod de lucru:

Într-un balon cotat de 100 ml s-a introdus o cantitate de 0.162g dialiltiosulfinat p.a, cântărită la balanța analitică și s-a adus la semn cu alcool izopropilic.

În nouă eprubete s-au introdus următoarele cantități de soluție de alicina 1 mM % în alcool izopropilic:

Nr. crt.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
V ml	0.5	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50
Tiosulf. mM	0.005	0.0075	0.010	0.0125	0.0150	0.0175	0.020	0.0225	0.025
Tiosulf. mg	0.81	1.215	1.62	2.025	2.43	2.83	3.24	3.645	4.05

În fiecare din aceste eprubete s-au mai introdus: 1ml de N-metilmaleinimidă 0.05m, 1ml KOH 0.25n , 1.5ml acid ascorbic 1% și alcool izopropilic până la un volum final de 6 ml. Reactivii s-au adăugat în picături și sub agitarea permanentă a amestecului. Amestecurile astfel obținute s-au introdus într-un vas conținând apă cu gheață. Reacția s-

a considerat definitivată după 10 minute, când s-a obținut un compus stabil de colorație roșie. Absorbanțele amestecurilor s-au determinat la 515nm.

Curba etalon pentru determinarea tiosulfinaților este prezentată în tabelul 3.2 și graficul 3.1.

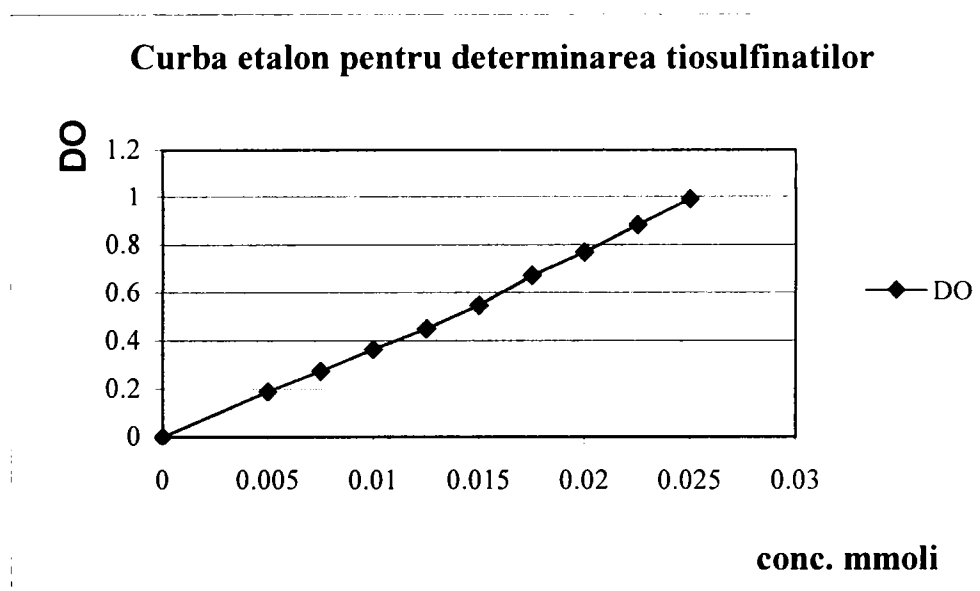
**Curba etalon pentru determinarea tiosulfinaților prin metoda cu N-
etilmaleimidă**

Tabel nr. 3.2

Nr.probă	1	2	3	4	5	6	7	8	9
tio sulfinați mmoli	0.005	0.0075	0.01	0.0125	0.015	0.0175	0.02	0.0225	0.025
Absorbanță	0.19	0.275	0.365	0.45	0.548	0.675	0.77	0.882	0.99

Pentru valorile determinate ale extincției funcție de concentrațiile diferite ale etalonului, s-a obținut un grad de corelație $r = 0.998621$; ecuația de regresie corespunde unei drepte: $y = 0.005234x + 0.034255$

Graficul 3.1



Tiosulfinații au fost determinați din extractele de *Allium sativum* prin procedeul de extracție cu dietileter.

Modul de lucru

Într-o pâlnie de separare s-au introdus 15 ml extract peste care s-au adăugat 30 ml dietileter; după o agitare energetică timp de 5 minute și separarea fazelor, faza apoasă a fost reextrasă cu încă 30 ml dietileter. Extractul eteric a fost evaporat la temperatura camerei până la dispariția mirosului caracteristic al eterului. Rezidului obținut i s-au adăugat 2 ml alcool izopropilic iar după o agitare eficientă, soluția obținută a fost diluată cu același solvent de 100 de ori. Acest extract a fost apoi supus în continuare determinării tiosulfinaților.

La 1 ml extract s-a adăugat 1 ml de N-etilmaleinimidă 0.05m; peste acest amestec s-au adăugat, în picături și sub agitare, 1 ml de KOH 0.25 m, și 1.5 ml acid ascorbic 1%. Amestecul a fost introdus într-o capsulă conținând agent de răcire (apă cu gheață). După 10 minute reacția s-a considerat definitivată, obținându-se o colorație roșie. Concentrația tiosulfinaților s-a efectuat prin citirea absorbantei probei la 515 nm.

Rezultatele determinărilor sunt prezentate în tabelul 3.4.

Valorile parametrilor obținuți sunt apropiate de valorile obținute în literatura de specialitate (17,50, 55) pentru *Allium sativum* provenind din alte regiuni ale globului.

3.2. Rezultate și discuții

În tabelul 3.1 este prezentată variația condițiilor de reacție a câtorva din extractele obținute prin distilare uscată.

Cele mai bune rezultate obținute, după testarea bactericidă și bacteriostatică au fost obținute cu extractele obținute în mediu de gaz inert (N_2 sau CO_2), la temperaturi între 80-120 °C și 20-30 mmHg.

Testarea bactericidă și bacteriostatică a fost efectuată prin metoda diluțiilor succesive și este prezentată în subcapitolul 6.1.

Prin distilare uscată, la temperaturi sub 120°C, s-au obținut produse de distilare având aspectul de lichide uleioase vâscoase de culoare alb-gălbuie cu densitatea medie de $\rho^{20^\circ} = 1.341 \pm 0.029$, pe când la temperaturi mai mari de 120 °C s-au obținut distilate închise la culoare, cu vâscozitate ridicată și inactive din punct de vedere biologic.

Datele obținute în urma efectuării determinării principalilor bioconstituenți asupra fiecărei șarje din cele două tipuri de extracte obținute experimental sunt prezentate în tabelul 3.3.

Valorile medii ale principalilor componenți chimici din extractele de *Allium sativum*

Tabelul 3.3.

	64.3±3.32	1.15 ± 0.2	27.6 ±1.2	0.2 ± 0.03	6.2 ± 0.71
	5.9 ± 1.33	3.93± 0.5	-	7.2 ±0.5	3.0 ± 0.15
	73.3± 1.25	0.8 ± 0.02	20.3 ± 0.98	0.24 ±0.04	6.36± 0.27

Compoziția extractelor , în principalii componenți chimici se situează la valori similare cu a celor menționate în literatura de specialitate la celelalte specii de *Allium sativum* (17). Astfel se constată că nu există diferențe semnificative în bioconstituenții principali ai speciei în funcție de condițiile pedoclimatice.

Din extractele obținute prin metodele prezentate anterior au fost efectuate și determinările a câtorva bioelemente cu ajutorul unui spectrofotometru cu absorbție atomică.

Rezultatele sunt prezentate , pentru ambele tipuri de extracte în tabelul 3.4 și 3.5.

Valorile unor macroelemente determinate în extractele obținute de *Allium sativum*

Tabelul 3.4

	60 ± 12	50±8.3	420±37	49±13	34±12	15±22	90±10.2
	54±0.9	25±3.0	350±12	50±3.5	30±0.8	20±1.5	108±12
	62±0.5	55±1.3	480±23	55±62	31±0.7	16±18	92±3.2

**Valorile medii ale unor microelemente determinate în extractele obținute de
Allium sativum**

Tabelul 3.5

	3.2± 0.25	1.8± 1.02	0.72± 0.12	0.5± 0.25	0.5± 0.05	0.1± 0.02	0.15± 0.1	10± 3.4	urme
	3.7± 0.78	0.9± 0.13	0.5± 0.07	0.51± 0.15	0.31± 0.09	0.075 ±0.02	0.1± 0.15	2 ± 0.5	urme
	3.6 ± 0.20	1.5± 0.9	0.60± 0.21	0.72± 0.12	0.60± 0.10	0.2± 0.05	0.30± 0.02	15± 3.3	urme

Din datele prezentate în tabelul 3.4 se constată valori apropiate ale macroelementelor de valorile indicate de literatura de specialitate (56); în ceea ce privește cantitatea de seleniu , care , în medie , se situează la valori de 10-15 $\mu\text{g} \%$, sunt cu 15 % mai ridicate față de valorile întâlnite în literatură; restul valorilor microelementelor determinate se situează la valori apropiate de a celor din literatura de specialitate .

Conținutul în tiosulfinați a fost determinat după diferite intervale de timp de depozitare la 4°C, respectiv 22 ° C.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3.6 și graficele 3.2- 3.5

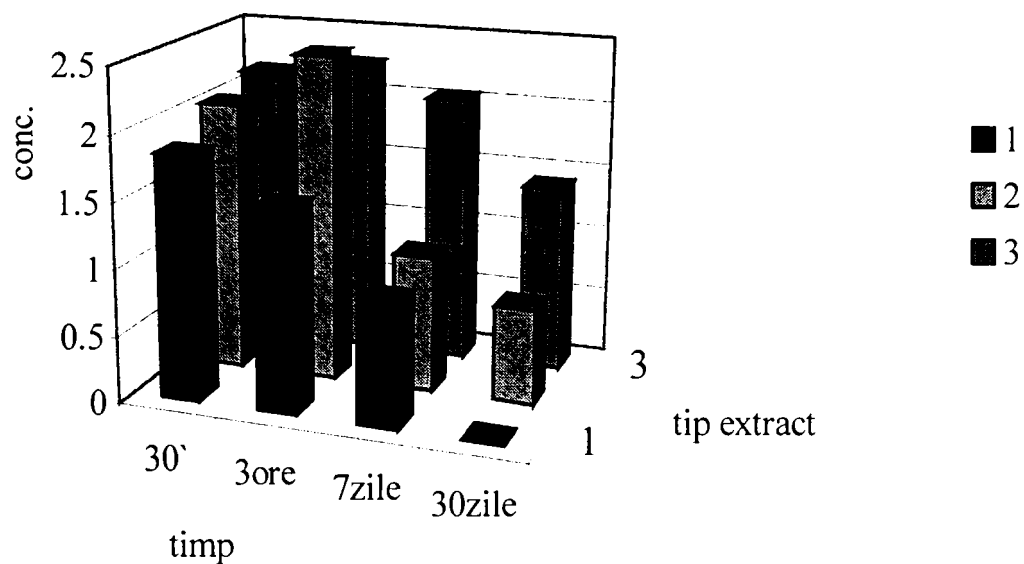
Conținutul în tiosulfinaților (mmol/ 100ml extract) din extractele de Allium sativum, în funcție de durata , temperatura de păstrare și condiționare a acestora

Tabelul 3.6

	1.84 ±0.21	3.30 ±0.12	1.52 ±0.10	3.89 ±0.31	0.92 ±0.07	3.56 ±0.50	-	0.47 ±0.20
	3.05 ±0.18	3.46 ±0.41	3.47 ±0.23	3.69 ±0.17	1.02 ±0.09	3.47 ±0.25	0.71 ±0.12	1.12 ±0.17
	3.15 ±0.03	3.20 ±0.15	3.25 ±0.61	3.91 ±0.21	3.04 ±0.05	3.79 ±0.52	1.41 ±0.30	3.51 ±0.11

Graficul 3.2

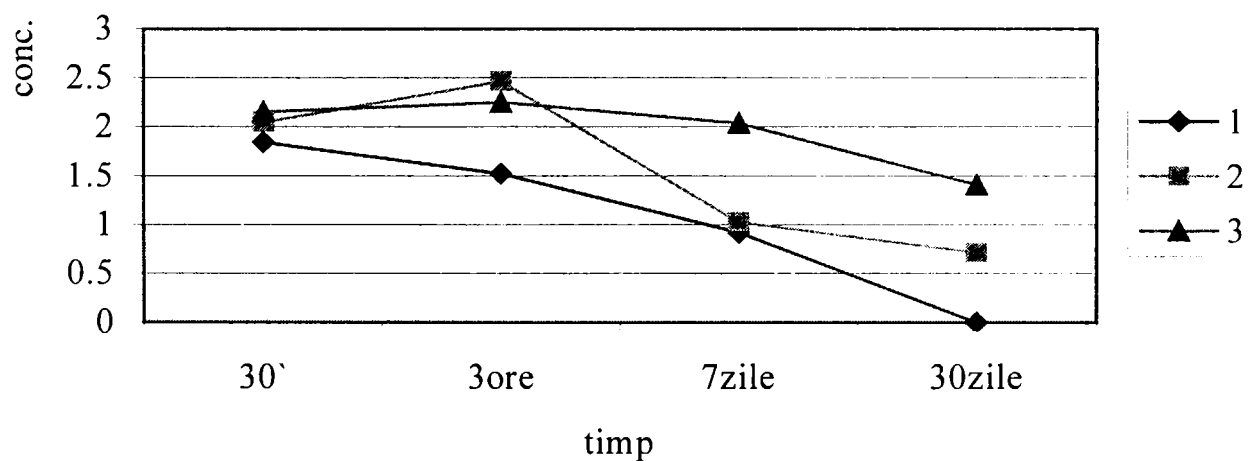
Variatia tiosulfinaților prezenti în diferite tipuri de extracte, la 22 grade C



1- extract distilare uscată; 2- extract apos 2(bulbi):1(tampon); 3- extract apos stabilizat

Graficul 3.3

Variatia concentratiei tiosulfinaților la depozitarea extractelor la temperatura de 22 grade C



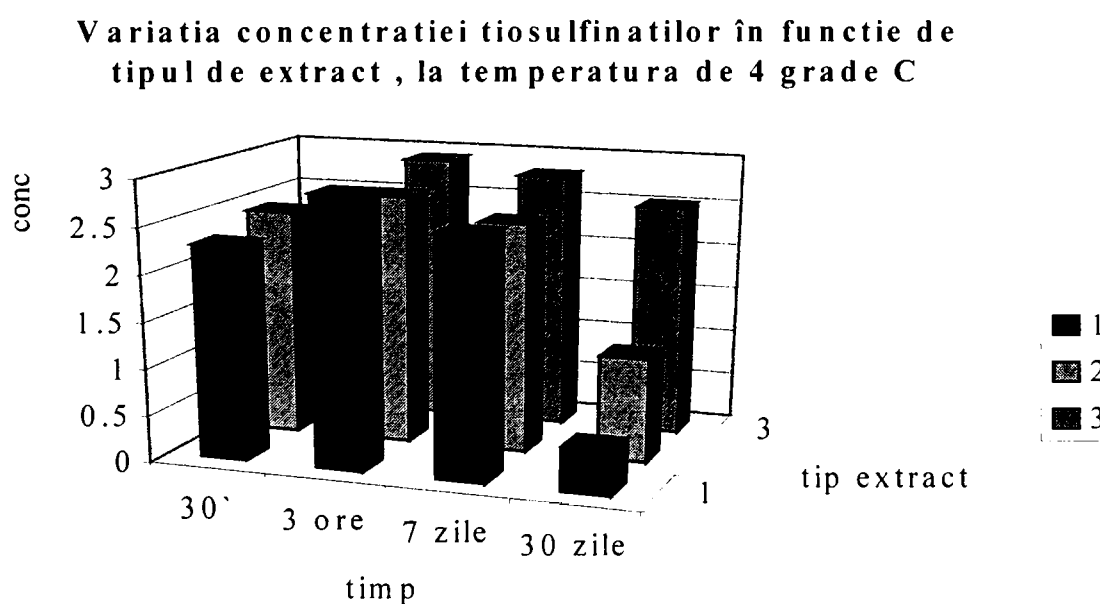
1-extract distilare uscată; 2- extract apos 2(bulbi):1(tampon); 3- extract apos stabilizat

Din datele prezentate anterior se observă un conținut în tiosulfinați mai crescut cu 7.6% în extractul apos prelucrat la temperatura de 4°C , față de extractul obținut prin distilare uscată, și cu 26.21% mai mare față de extractul apos menținut la temperatura de 22 ° C. Acest conținut în tiosulfinați crește după 3 ore cu 8.6 % la extractul apos obținut la 4°C , respectiv cu 44.5 % față de extractul menținut la temperatura de 22 ° C.

După 7 zile , în urma repetării determinării cantității în tiosulfinați , se observă o scădere cu 8.9 % a concentrației acestora, la extractele apoase menținute la 4° C, pe când la cele menținute la 22°C, se observă o scădere cu 41.29 %.

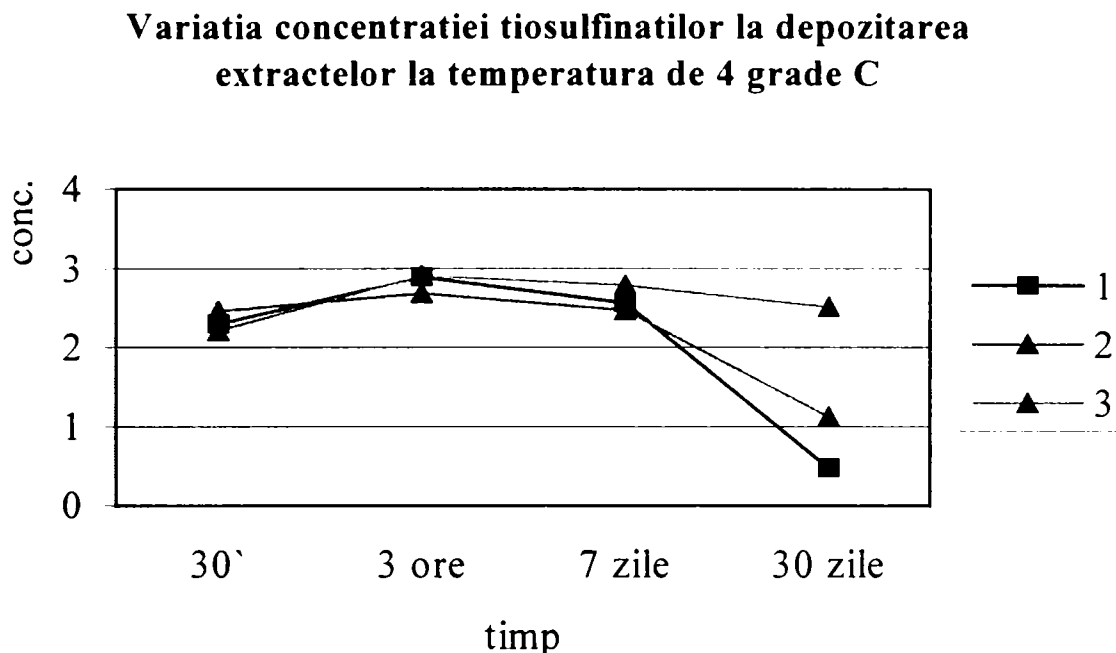
După 30 de zile , reducerea cantității de tiosulfinați este și mai drastică, ajungând aproape de 1/3 din conținut atât la extractele menținute la 22°C cât și la cele menținute la 4°C. O cantitate de tiosulfinați , redusă cu numai 13.75 % se observă la extractul apos condiționat în 10% glicerină.

Graficul 3.4



1- extract distilare uscată; 2- extract apos 2(bulbi):1(tampon); 3- extract apos stabilizat

Graficul 3.5.



1-extract distilare uscată; 2- extract apos 2(bulbi):1(tampon); 3- extract apos stabilizat

3.3. Concluzii

- Principalii bioconstituenți ai *Allium sativum* autohton se situează la valori comparabile cu a altor specii de *Allium sativum*; deci aceștia nu sunt influențați esențial de condițiile pedoclimatice
- Se observă valori medii mai mari ale mineralelor în extractul apos față de cele determinate în extractul obținut prin distilare uscată dar care se situează, la ambele tipuri de extracte, la valori apropiate de cele redată în literatura de specialitate; astfel se înregistrează valori ale Ca și Mg ce se situează la limita inferioară a datelor din literatură, pentru extractul apos, pe când sulful înregistrează valori cu 10%, respectiv fosforul cu 8%, mai ridicate față de valorile întâlnite în literatură; dintre microelemente se remarcă seleniul, care se situează la valori cu 15% mai ridicate față de valorile întâlnite în literatură; restul valorilor microelementelor determinate se situează la valori apropiate de a celor din literatura de specialitate (56).
- Cantitatea de tiosulfinați se reduce considerabil la extractul obținut prin distilare uscată, în urma menținerii extractului la temperatura camerei și la

aproximativ 1/3 din valoarea inițială , după 30 de zile de stocare la temperatura de 4°C.

- Tiosulfinații suferă o depreciere aproape insesizabilă la extractul apos condiționat cu glicerină și menținut la temperatura de 4°C.
- Se observă în acest fel o influență semnificativă , atât a modului de obținere a extractului cât și a condiționării acestuia; rezultate superioare în menținerea principiilor activi ai extractului se pot realiza prin stocarea extractului apos la temperaturi de 4°C, cu 10% adaos de glicerină ca stabilizator.

CAPITOLUL 4

SINTEZA UNOR S-ALCHIL-L-CISTEINE ȘI A SULFOXIZILOR LOR CORESPUNZĂTORI

4.1. CONSIDERAȚII TEORETICE

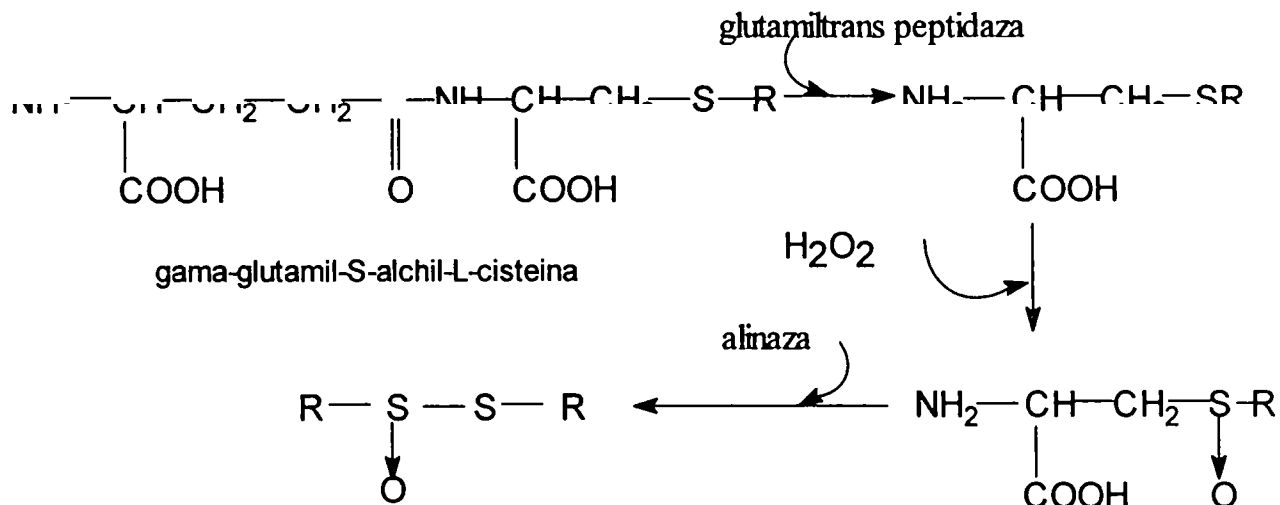
În urma investigațiilor efectuate asupra compoziției extractelor de *Allium sativum*, în ultimii ani s-a încercat să se stabilească care sunt compușii primari responsabili atât de aroma caracteristică a acestuia dar mai ales de activitatea fiziologică a acestuia.

Majoritatea cercetătorilor au stabilit formarea în principal a tiosulfinaților numai în momentul distrugerii țesuturilor de *Allium sativum* precum și a altor compuși care se formează în cursul catabolizării celor dintâi.

Stoll și Seebeck (288) au evidențiat în 1948, un precursor al alicinei, pe care l-au denumit alliină. Prin intermediul enzimei alinaza, alliina se transformă rapid, în urma lezării materialului vegetal, în alicină, proces în urma căruia se formează amoniac și un cetoacid.

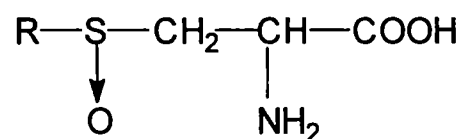
Din cei 4 izomeri optici posibili , alliina s-a dovedit a fi identică cu izomerul (+) S-alil-L-cistein sulfonatului. Ea însăși este o substanță fără miros, hidrosolubilă și destul de stabilă.

Pe lângă (+)-S-alil-L-cisteina și a derivaților ei se mai formează și alți compuși generatori ai alchilcisteinsulfoxizilor, cum ar fi γ -glutamil-S-alchil-cisteinele, precum și o clasă de compuși ciclici derivați ai alchil-L-cisteinelor, denumiți ajone.



Atât biosinteza acestor compuși cât și ultimele date din literatura de specialitate au fost prezentate în prima parte a tezei.

S-a constatat că alinaza nu prezintă specificitate strictă pentru aliină ci acțiunii ei sunt supuși toți derivații cisteinei cu formula generală :



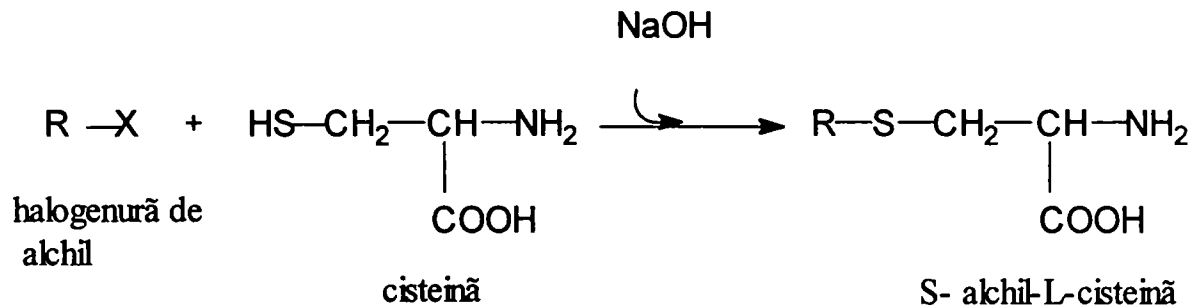
Unde R = trans-1-propenil-, trans-2-propenil-, -metil-, -etil-, -propil-, etc. iar gruparea -NH₂ nu poate fi substituită. Atomul de sulf trebuie să apară ca sulfoxid, iar dintre cei doi atomi de hidrogen ai grupării metilenice din β, doar unul din ei poate fi substituit (139).

Singura specificitate a acțiunii enzimei constă în scindarea rapidă doar a derivaților cu configurația optică identică cu cea a aliinei naturale (izomerul (+)-S-alil-L-cisteinei). Scindarea (-)S-alil-L-cisteinei decurge încet, iar izomerii derivați de la D-cisteină nu sunt afectați de acțiunea acestei enzime.

4.2. Sinteza S-alchil-L-cisteinelor

4.2.1. Material și metodă

Sinteza S-alchil-L-cisteinelor se bazează pe reacția generală:



S-alchil-L-cisteinele sintetizate precum și materiile prime utilizate sunt prezentate în tabelul 4.1

Tabelul 4.1

Nr. ord.	Substanța sintetizată		Materii prime		
	Halogenura de alchil	Halogenura de alchil	Produs de bază	Amplificator	Producător
1.	S-metil-L-cisteină	CH ₃ -J	Merck	L(+)-Cisteină	Fluka
2.	S-etil-L-cisteină	C ₂ H ₅ -Br		L(+)-Cisteină	
3.	S-propil-L-cisteină	C ₃ H ₇ -Br		L(+)-Cisteină	
4.	S-butil-L-cisteină	C ₄ H ₉ -Br		L(+)-Cisteină	
5.	S-heptil-L-cisteină	C ₇ H ₁₅ -Br		L(+)-Cisteină	
6.	S-alil-L-cisteină	C ₃ H ₅ -Cl	Fluka	L(+)-Cisteină	

S-a lucrat după o metodă generală (137) utilizând rapoartele molare cisteină: halogenură de alchil între 1: 1.1-1.3, în diferiți solvenți: alcool metilic, alcool etilic, acetonă, la temperaturi cuprinse între 18-40°C, la un interval de pH= 5-7.

În final s-a pus la punct o metodă de sinteză aplicată pentru toți derivații S-alchil (alchenil)-L-cisteinei obținuți.

Într-un balon cu 3 găuri, de 250 ml, prevăzut cu agitator, termometru și pâlnie de picurare, s-au introdus 3.0g (0.025 moli) L-cisteină și 120 ml alcool etilic. După emulsionarea întregii cantități de L-cisteină, s-au adăugat 43.75ml (0.0875 moli) NaOH 2n.

În emulsia aflată sub agitare s-a introdus, picătură cu picătură, 1.71 ml (0.0275 moli) iodură de metil. După adăugarea halogenurii s-a observat o creștere a temperaturii la 30°C. Temperatura s-a reglat la 35°C după care soluția alcoolică s-a acidulat, în picături, cu acid acetic glacial până la o valoare constantă a pH-ului de 5.5. Perfectarea reacției a avut loc sub agitare, temperatura menținându-se la 35 °C timp de 3 ore.

După terminarea reacției, amestecul obținut s-a răcit la 4°C și s-a menținut la această temperatură timp de 12 ore. S-au obținut precipitate alb- gălbui care s-au filtrat ulterior pe o pânză Buchner.

Precipitatul astfel obținut , s-a uscat la 50 °C în etuvă, rezultând alchilcisteina brută. Randamentele de reacție au fost cuprinse între 27 –60.5 % produs brut.

O purificare a produsului brut s-a realizat ulterior prin redizolvarea precipitatului uscat într-o cantitate minimă de acid acetic 1 %. Pentru precipitare, la aceste soluții s-a adăugat alcool etilic fierbinte în raport de 1 : 15(sol.inițială: alcool). După răcire, suspensia a fost menținută timp de 12 ore la 4°C.

După filtrare , precipitatul a fost uscat în etuvă la 50 °C, obținându-se precipitate albe cristaline.

Produșilor de reacție li s-a determinat : punctul de topire, rotația specifică, analiza elementală, spectrul IR (în pastile de KBr) și spectrul RMN.

Determinarea rotației specifice

Într-un balon cotat de 25 ml s-au introdus în jur de 0.5 g S-alchil-L-cisteină, cântărită cu precizie la balanța analitică; s-a adus la semn cu alcool metilic.

Soluției astfel obținute i s-a determinat puterea rotatorie.

Rotația specifică s-a calculat cu ajutorul formulei :

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{100 \times [\alpha]_D^{25} \text{ sol}}{l \times c}$$

Unde l = lungimea probei (dm); c = concentrația substanței (g/ml)

4.2.2 . Rezultate și discuții

S-au realizat sintezele a 6 derivați ai S-alkil-L-cisteinei conform reacției generale prezentate anterior. În urma efectuării acestor sinteze în diferite condiții de reacție, cele mai bune randamente s-au obținut în condițiile prezentate în tabelul 4.2.

S-a observat necesitatea menținerii unei temperaturi sub 35 °C , utilizării drept mediu de reacție a alcoolilor precum și realizarea unui pH acid prin adăugarea unui mic exces de acid acetic glacial. De asemenea , în ceea ce privește raportul dintre reactanți L(+)-cisteină : halogenură de alchil este necesar să se mențină un mic exces de halogenură , pentru asigurarea perfectării reacției.

Sinteza unor S-alkil-L-cisteine

Tabelul 4.2

Nr. C. Sinteza	Reacții	Cantitate	Temperatura	Mediu de reacție	Condiții de reacție	Rendament (%)
1	L-cisteină	0.025	3.0	-	EtOH t= 35°C τ = 3 ore pH = 5.5	43.5
	CH ₃ -J	0.0275	3.9	1.71		
	NaOH 2n	0.0875	-	43.75		
2	L-cisteină	0.025	3.0	-	EtOH t= 30°C τ = 5 ore pH = 6.5	53.8
	C ₂ H ₅ -Br (98%)	0.0275	2.1	2.29		
	NaOH 2n	0.0875	-	43.75		

Sinteză L-cisteină	L-cisteină	0.025	3.0	-	EtOH	t= 35°C	49.5
	C ₃ H ₇ -Br (98%)	0.0275	3.4	2.5		τ = 3 ore	
	NaOH 2n	0.0875	-	43.75		pH = 6.5	
Sinteză L-cisteină	L-cisteină	0.025	3.0	-	EtOH	t= 35°C	55.4
	C ₄ H ₉ -Br	0.0275	3.8	2.94		τ = 3 ore	
	NaOH 2n	0.0875	-	43.75		pH = 5.5	
Sinteză L-cisteină	L-cisteină	0.025	3.0	-	EtOH	t= 35°C	46.2
	C ₇ H ₁₅ -Br	0.0275	4.9	4.32		τ = 6 ore	
	NaOH 2n	0.0875	-	43.75		pH = 5.5	
Sinteză L-cisteină	L-cisteină	0.025	3.0	-	EtOH	t= 30°C	55.3
	CH ₂ =CH- CH ₂ Cl (98%)	0.0275	2.2	2.3		τ = 3 ore	
	NaOH 2n	0.0875	-	43.75		pH = 5.5	

Randamentele de reacție obținute se situează între 43 –55.4 %.

Randamentele de purificare obținute au fost cuprinse în intervalul 89 - 92.4 %.

Fiecare dintre produșii obținuți a fost caracterizat în ceea ce privește proprietățile lui fizice.

În tabelul 4.2.1 sunt prezentați punctul de topire și valoarea unghiului de rotație al produselor obținute.

Proprietățile fizice ale S-alchil-L-cisteinelor

Tabelul 4.2.1

Nr. ord.	Denumire	Formă	Temperatură (°C)		Densitate (g/cm ³)	
			la 20°C	la 25°C	la 20°C	la 25°C
1	Sulfetil-L-cisteină	pulbere albă	240-242	232-235	21.5	20
2	Sulfopropil-L-cisteină	pulbere alb-gălbuie	240-242	235-238	23.8	22
3	Sulfobutil-L-cisteină	pulbere albă	242-243	228-230	25.8	24.7
4	Sulfopentil-L-cisteină	* pulbere albă	240-242	240-242	19	17.3
5	Sulfheptil-L-cisteină	pulbere albă	242-243	232-235	18.5	18.3
6	Sulfnonyl-L-cisteină	pulbere alb-gălbuie	218-219	206-209	15.2	15.8

Pentru verificarea purității produșilor de reacție li s-a efectuat analiza elementală (tabelul 4.2.2) și li s-au trasat spectrele IR , în pastilă de KBr (tabelul 4.2.3., figurile 4.2.1- 4.2.3) și spectrele RMN (figurile 4.2.4 – 4.2.6).

Rezultatele analizei elementale pentru S-alchil-L -cisteinelor

Tabelul 4.2.2

Nr. ord.	Denumire	C %		H %		N %		S %	
		lit.	Det.	lit.	Det.	lit.	Det.	lit.	Det.
1	Sulfetil-L-cis	35.55	35.15	6.66	6.72	10.37	9.70	23.70	24.56
2	Sulfopropil-L-cis	40.26	39.10	7.38	6.92	9.39	10.06	21.47	21.70
3	Sulfobutil-L-cis	44.17	44.68	7.97	7.08	8.58	7.90	19.63	19.19
4	Sulfopentil-L-cis	44.72	44.84	6.83	6.97	8.69	8.58	19.87	20.05

ATRIBUIRILE SPECTRELOR IR (KBr) pentru câteva S-ALCHIL -L-CISTEINE

Tabelul 4.3.2.

Nr. Crt.	Gruparea	Banda teoretică cm ⁻¹	S-metil-L-cis	S-etil-L-cis	S-propil-L-cis	S-alil-L-cis
			obținut practic cm ⁻¹			
1.	COO ⁻	ν C=O asim: 1550-1610 i ν C=O sim: 1320-1420m-i	1580 1410	1590 1420	1570 1405	1590 1435
2.	NH ₃ ⁺ Banda I Aa BandaII Aa	ν:2800-3200 i δ:2400-2810 i ν asim.NH ₃ ⁺ : 1610-1660 i ν simNH ₃ ⁺ : 1485-1550 i	2920 2720 1510	2990 2550 1505	2950 1525	2970 2610 1510
3.	RCH=CH ₂	ν:3025-3092 δ: 1430-1445	-	-	-	1440 Suprapus nerelevant
4.	C-S	ν: 670-705	676	680	690	690
5.	-CH ₂ -S	ν as: 2922-2948 ν sim: 2846-2878 γ: 1220-1270i	Suprapus cu NH ₃ 1260	Suprapus cu NH ₃ 1270	Suprapus cu NH ₃ 1270	Suprapus cu NH ₃ 1240
6.	CH ₃ -S-R	δ sim: 1290-1330s-m	1310	-	-	-
7.	Alif-CH ₃	ν as: 2952-2972 ν sim: 2862-2882	-	2800 posibil suprapus	2900 suprapus	-

Aa= aminoacizi

În ceea ce privește analiza prin spectroscopie RMN , substanțele au fost solubilizate numai în apă deuterată și li s-au efectuat spectrele ¹H-RMN.

În structura S-alil-L-cisteinei sunt puși în evidență protonii etilenici (zona 5-5.5ppm). Protonii mobili aminici și carboxilici sunt mascați de semnalul apei. S-au utilizat 20-30 mg/probă, iar măsurătorile s-au executat la o durată de puls $p_w=10-11$ milisecunde la 64-128 tranzienți respectiv la 64-128 de acumulări, în tuburi standard. Nu s-a utilizat drept standard tetrametilsilanul (TMS), valoarea deplasărilor chimice fiind măsurată față de picul solventului.

Analiza spectrului $^1\text{H-RMN}$ a S-metil-L-cisteinei a pus în evidență următoarele atribuiri: Semnalul de la $\delta = 2.06$ ppm singlet corespunde $-\text{CH}_3$; între 3.06 și 2.87 ppm se găsește $-\text{CH}_2$ (β) iar între 3.92 și 3.83 ppm se regăsește protonul de la $-\text{CH}(\alpha)$; la 4.7955 ppm apare semnalul apei deuterate utilizată ca solvent .

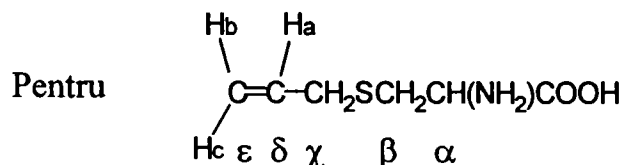


Analiza spectrului $^1\text{H-RMN}$ a S-etil-L-cistein ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$) a pus în evidență prezența protonilor grupărilor CH_2 (β) și $-\text{CH}(\alpha)$ prin deplasările chimice la $\delta=3.06$ și 2.90ppm; gruparea C_2H_5- a fost acoperită de semnalul solventului (figura 4.2.4).

În ceea ce privește analiza spectrului $^1\text{H-RMN}$ a ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$) S-propil-L-cisteinei, s-au evidențiat următoarele: $\varepsilon \quad \delta \quad \chi \quad \beta \quad \alpha$

Protonii grupării CH_3 (ε) au suferit o deplasare chimică la $\delta = 0.86$ ppm având o constantă de cuplaj $J = 7.3$ Hz iar cei de la gruparea CH_2 (δ) au prezentat o deplasare chimică la $\delta = 1.52$ și o constantă de cuplaj $J = 6.8$ Hz ceea ce se observă din figura 5. Protonii grupării CH_2 (χ) au prezentat o deplasare chimică la $\delta = 2.5$ ppm, cei ai grupării CH_2 (β) la $\delta_1=3.03$ ppm respectiv $\delta_2= 2.91$ ppm și constantele de cuplaj $J_{\text{vic}}= 7.0$ Hz și $J_{\text{gem}}=14.8$ Hz respectiv $\text{CH}(\alpha)$ a înregistrat o deplasare chimică la $\delta=3.83$ ppm și o constantă de cuplaj $J_{\text{vic}}=3.1$ Hz (figura 4.2.5).

În ceea ce privește atribuiri din spectrul S-alil-L-cisteinei, acestea sunt redate în figura 4.2.6.



s-au determinat următoarele atribuiri: Protonul corespunzând grupării $\text{CH}(\alpha)$ prezintă o deplasare chimică la $\delta= 3.83$, cei corespunzători grupării CH_2 (β) prezintă o deplasare

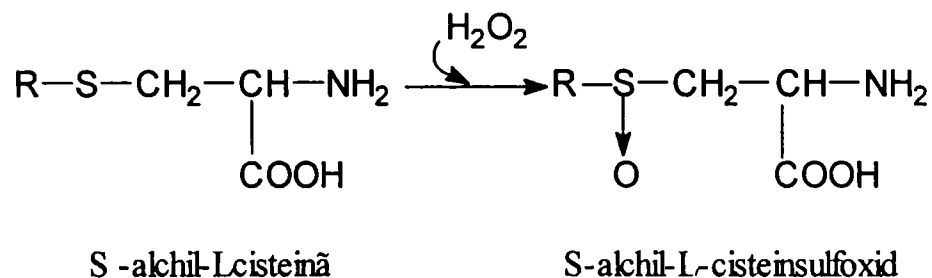
chimică la $\delta_1=2.88$ ppm (d-d) și constantele de cuplaj $J_{vic}=7.4$ Hz și $J_{gem}=14.9$ Hz , respectiv $\delta_2=2.99$ ppm (d) și constanta de cuplaj $J_{gem}=14.9$ Hz. În ceea ce privește protonii grupării CH_2 (χ) se observă prezența unei deplasări chimice la $\delta=3.14$ ppm (d) și o constantă de cuplaj $J_{vic}=7.0$ Hz.

Protonii corespunzând grupării CH_2 (ϵ) Hb și Hc se regăsesc la $\delta=5.14$ ppm (suprapuși) iar Ha se regăsește la $\delta=5.76$, cu constantele de cuplaj $J_{cis}(a\text{ cu }b)=8.0$ Hz, $J_{trans}(a\text{ cu }c)=16.0$ Hz și $J_{vic}=8.0$ Hz deci Ha este d-d-d.

4.3. Sinteza alchil-cistein sulfoxizilor

4.3.1. Material și metodă

Sinteza alchil cistein sulfoxizilor se bazează pe reacția de oxidare a S-alchil-L-cisteinelor , cu apă oxigenată , conform reacției generale:



Ca materie primă s-au utilizat S-alchil-L-cisteinele obținute de noi în laborator, după metodele prezentate în subcapitolul anterior.

Sintezele alchilcisteinsulfoxizilor s-au realizat după următoarea metodă generală:

Într-un balon cu două gâturi , de 100 ml, prevăzut cu agitator și pâlnie de picurare s-au introdus 0.78g (0.0058 moli) S-metil-L-cisteină, 30ml apă distilată și 2.5ml acid acetic glacial.

Conținutul balonului a fost supus agitării până la completa dizolvare a S-metil-L-cisteinei. S-au adăugat apoi, sub agitare și în picături, 1.2 ml (0.0116moli) apă oxigenată (30 %). Pentru perfectarea reacției de oxidare amestecul de reacție s-a menținut sub agitare timp de 12 ore. Pe măsura avansării reacției aspectul masei de reacție a devenit tot mai vâscos. Acesta s-a menținut în repaus timp de 12 ore la întuneric.

Masa de reacție obținută s-a dizolvat, la cald , într-un amestec de acetonă: apă: acid acetic glacial (65: 34: 1) în volume. După răcire la temperatura camerei, soluția s-a păstrat la 4°C timp de 10 ore. Precipitatul alb obținut , s-a filtrat pe o pâlnie Buchner și s-a spălat pe filtru, în porțiuni, cu același amestec de solvenți.

Uscarea produsului s-a efectuat la 50 °C, în etuvă.

Purificarea produsului s-a realizat prin recristalizarea acestuia într-un amestec de acetonă: apă: acid acetic glacial în proporție de 70:28:1 în volume. S-au obținut produși de culoare albă , cu puncte de topire ce s-au situat la valori cu aproximativ 80° C mai scăzute față de a S- alchil-L-cisteinelor din care au fost obținuți.

În tabelul 4.3 sunt prezentate condițiile de reacție și randamentele de obținere a S-alchil-L-cisteinsulfoxizilor.

Prođușilor de reacție li s-au determinat punctele de topire , unghiul de rotație specifică, analiza elementală (tabelul 4.3.1-4.3.2.), spectrul IR (în pastilă de KBr) (tabelul 4.3.3. și figurile 4.3.1-4.3.3) și spectrul RMN(figurile 4.3.4 - 4.3.6).

Sinteza S-alchil-L-cistein-sulfoxizilor Tabelul 4.3

Nr.	Reacții	Condiții de reacție			Mediu de reacție	Condiții de reacție	Temperatura de topire, °C
		mol	g	ml			
		3	4	5	6	7	8
1	S-alchil-L-cistein-sulfoxid	0.0058	0.78	-	CH ₃ COOH H ₂ O	t= 25°C	42.5
	30%	0.0116	1.32	1.2		τ = 12 ore	
						pH = 5	
2	S-alchil-L-cistein-sulfoxid	0.013	2	-	CH ₃ COOH H ₂ O	t= 25°C	55.7
	30%	0.026	2.93	2.66		τ = 12 ore	
						pH = 5	
3	S-alchil-L-cistein-sulfoxid	0.0061	1	-	CH ₃ COOH H ₂ O	t= 25°C	49.5
	30%	0.012	1.35	1.23		τ = 12 ore	
						pH = 4.5	

Sulfonamide Sulfonamide Sulfonamide Sulfonamide Sulfonamide Sulfonamide	0.0056	1	-	CH ₃ COOH H ₂ O	t= 25°C	52.3
	0.0112	1.26	1.15		τ = 12 ore	
					pH = 4.5	
	0.0046	1	-	CH ₃ COOH H ₂ O	t= 25°C	41.4
	0.0092	0.93	0.85		τ = 12 ore	
					pH = 4.5	
Sulfonamide Sulfonamide Sulfonamide	0.0093	1.5	-	CH ₃ COOH H ₂ O	t= 25°C	55.26
	0.018	2.02	1.83		τ = 12 ore	
					pH = 4	

Proprietățile fizice ale S-alkil-L-cisteinsulfoxizilor sintetizați

Tabelul 4.3.1

1	pulbere albă	161-162	167-168	3.7	3.9
2	pulbere albă, luciu metalic	166-167	164-166	5.1	5.6

1	Sulfonilazid Sulfonilazid Sulfonilazid	pulbere albă	161-164	158-161	11.2	10.6
2	Sulfonilazid Sulfonilazid Sulfonilazid	pulbere albă	158-160	163-166	12.1	11.8
3	Sulfonilazid Sulfonilazid Sulfonilazid	pulbere albă	-	152-156	-	14.1
4	Sulfonilazid Sulfonilazid Sulfonilazid	alb-gălbuie	148-149	150-153	8.9	8.5

Rezultatele analizei elementale în cazul S-alchil-L-cistein sulfoxizilor

Tabelul 4.3.2.

Cantitate	Echantilon	Cantitate (%)							
		C	H	N	S	O	Cl	Br	I
1	Sulfonilazid Sulfonilazid Sulfonilazid	31.78	32.77	5.96	6.70	9.27	8.58	21.19	21.05
2	Sulfonilazid Sulfonilazid Sulfonilazid	36.36	36.53	6.66	6.21	8.48	9.19	19.39	18.82
3	Sulfonilazid Sulfonilazid Sulfonilazid	40.22	39.42	7.26	6.64	7.82	8.20	17.87	17.90
4	Sulfonilazid Sulfonilazid Sulfonilazid	40.67	41.07	6.21	5.88	7.91	7.94	18.08	18.80

**ATRIBUIRILE SPECTRELOR IR (KBr) pentru S-ALCHIL-L-CISTEIN
SULFOXIZI**

Tabelul 4.3.3.

Nr. Crt.	Gruparea	Banda teoretică cm ⁻¹	S-metil- L-cisSO	S-etil-L- cisSO	S-propil- L-cisSO	S-alil-L- cisSO
			obținut practic cm ⁻¹			
1.	COO ⁻	ν C=O asim: 1550-1610 i ν C=O sim: 1320-1420m-i	1590 1410	1580 1420	1570 1400	1590 1425
2.	NH ₃ ⁺ Banda I Aa BandaII Aa	ν:2800-3200 i δ:2400-2810 i 2800 asim. NH ₃ ⁺ : 1610-1660 i ν simNH ₃ ⁺ : 1485-1550 i	2910 2620 1500	2980 2650 1495	2850 1525	2990 2510 1530
3.	RCH=CH ₂	ν:3025-3092 δ: 1430-1445	-	-	-	1440 Suprapus nerelevant
4.	C-S	ν: 670-705	680	690	690	690
5.	-CH ₂ -S	ν as: 2922-2948 ν sim: 2846-2878 γ: 1220-1270i	Suprapus cu NH ₃ 1250	Suprapus cu NH ₃ 1260	Suprapus cu NH ₃ 1270	Suprapus cu NH ₃ 1250
6.	CH ₃ -S-R	δ sim: 1290-1330s-m	1320	-	-	-
7.	Alif-CH ₃	ν as: 2952-2972 ν sim: 2862-2882	-	2870 posibil suprapus	2850 suprapus	-
8.	S-O	δ: 700-900	840	860	860	850
9.	S=O	δ: 1040-1200	1270	1190	1140	1130

Unde Aa= aminoacizi

În ceea ce privește analiza prin spectroscopie RMN, substanțele au fost solubilizate în apă deuterată și li s-au efectuat spectrele ¹H-RMN. Din spectrele

prezentate mai jos este relevantă clar diastereotopicitatea metilenului vicinal (CH_2 de lângă CH chiral).

În urma oxidării alchilcisteinelor, sulful devine centru chiral, astfel că ar fi posibilă existența a doi diastereoizomeri conformaționali dintre care numai unul ar putea fi decelat prin RMN datorită faptului că este de așteptat o interacție a oxigenului cu grupa aminică.

Se constată o evidentă deplasare a radicalilor alchil ceea ce denotă influența sulfului oxidat.

Protonii mobili aminici și carboxilici sunt mascați de semnalul apei.

S-au utilizat 20-30 mg/probă, iar măsurătorile s-au executat la o durată de puls $\text{pw}=10-11$ milisecunde la 64-128 tranzienți respectiv la 64-128 de acumulări, în tuburi standard.

Nu s-a utilizat drept standard tetrametilsilanul (TMS), valoarea deplasărilor chimice fiind măsurată față de picul solventului.

Analiza spectrului ^1H -RMN a S-metil-L-cistein sulfoxidului a pus în evidență următoarele atribuiri: deplasarea chimică de la $\delta=1.15$ ppm corespunde $-\text{CH}_3$ triplet cu o constantă de cuplaj $J=7.4$ Hz, $\delta=2.52$ ppm ce corespunde protonului de la $-\text{CH}(\alpha)$ quartet și având o constantă de cuplaj $J=7.1$ Hz iar protonii de la $-\text{CH}_2$ (β) apar ca d-d cu constantele de cuplaj $J=4.4$ Hz (cuplarea cu $-\text{CH}$) respectiv $J=7.5$ Hz (cuplarea cu grupa metil) și $J_{\text{gem}}=14.8$ Hz; deplasările chimice corespunzătoare sunt $\delta_1=3.04$ ppm și $\delta_2=2.93$ ppm.

δ χ β α

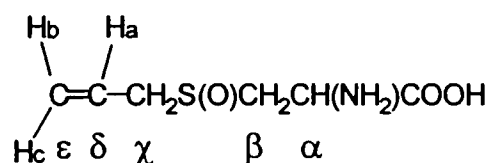
Analiza spectrului ^1H -RMN a ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$) S-etil-L-cistein sulfoxidului a evidențiat următoarele:

Deplasările chimice de la $\delta=1.26$ ppm corespund grupării CH_3 (δ), precum și constanta de cuplaj $J=7.3$ Hz; în ceea ce privește gruparea $-\text{CH}_2$ (χ), aceasta suferă influențele noului centru chiral apărut prin oxidarea sulfului și anume s-au evidențiat deplasările chimice $\delta=3.01-2.85$ ppm, pe când $\delta=3.16-3.09$ ppm corespund deplasărilor chimice ale protonului de la $-\text{CH}(\alpha)$. H_β apare la 3.34 ppm ca multiplu în regiunea 3.40-3.29 (figura 4.3.4).



Analiza spectrului $^1\text{H-RMN}$ a $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S(O)CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH})$ S-propil-L-cistein sulfoxidului a evidențiat următoarele : Se observă deplasarea chimică la $\delta=0.99$ ppm (triplet) corespunzătoare protonilor grupării $-\text{CH}_3$ (ε) , având o constantă de cuplaj $J_{\text{vic}}=7.4$ Hz, o deplasare chimică $\delta=1.72$ ppm (multiplet) și o constantă de cuplaj $J_{\text{vic}}=7.4$ Hz corespunzătoare protonilor grupării $-\text{CH}_2$ (δ) precum și o deplasare chimică la $\delta=2.90$ (cuartet) și o constantă de cuplaj $J_{\text{vic}}=7.8$ Hz corespunzând protonilor grupării CH_2 (χ) . Deasemenea protonilor grupării CH_2 (β) le corespunde o deplasare chimică la $\delta_1=3.14$ ppm și constantele de cuplaj $J_{\text{vic}}=7.8$ Hz și $J_{\text{gem}}=14.0$ Hz (datorită efectului +I al propilului), respectiv $\delta_2=3.36$ ppm și constantele de cuplaj $J_{\text{vic}}=6.0$ Hz și $J_{\text{gem}}=14.0$ Hz. Protonului grupării $\text{CH}(\alpha)$ îi corespunde o deplasare chimică $\delta=4.16$, o constantă de cuplaj $J_{\text{vic}}=7.2$ Hz și una $J_{\text{vic}}=14.0$ Hz, datorată influenței CH_2 (β). Aceste atribuiri sunt redate în figura 4.3.5.

În figura 4.3.6. este redat spectrul $^1\text{H-RMN}$ al S-alil-L-cistein sulfoxidului. Din acesta s-au determinat următoarele atribuiri:



Pentru protonii corespunzători grupării CH_2 (β) s-a determinat o deplasare chimică la $\delta_1=3.16$ ppm și constantele de cuplaj $J_{\text{vic}}=7.5$ Hz și $J_{\text{gem}}=13.4$ Hz , respectiv $\delta_2=3.37$ ppm și constantele de cuplaj $J_{\text{vic}}=6.1$ Hz și $J_{\text{gem}}=14.0$ Hz ; pentru protonii corespunzători grupării CH_2 (χ) s-a determinat o deplasare chimică la $\delta_1=3.58$ ppm și constantele de cuplaj $J_{\text{vic}}=8.3$ Hz și $J_{\text{gem}}=12.8$ Hz , respectiv $\delta_2=3.79$ ppm și constantele de cuplaj $J_{\text{vic}}=6.7$ Hz și $J_{\text{gem}}=13.2$ Hz iar pentru protonul corespunzător grupării $-\text{CH}(\alpha)$ s-a determinat o deplasare chimică de 4.15 ppm și respectiv o constantă de cuplaj $J_{\text{vic}}=6.2$ Hz.

În ceea ce privește protonii corespunzând grupării CH_2 (ε) respectiv $-\text{CH}(\delta)$: Ha se regăsește la $\delta=5.42$, cu constantele de cuplaj $J_{\text{trans}}(\text{a cu c})=17.6$ Hz , Hb are o deplasare chimică la $\delta=5.49$ ppm și o constantă de cuplaj $J_{\text{cis}}(\text{a cu b})=10.6$ Hz, iar Hc se regăsește la $\delta=5.84$ ppm (m).

S-a constatat că cu cât gruparea CH_2 se găsește mai aproape de centrul chiral cu atât separările sunt mai bune, crescând diferența între constantele de cuplaj (crește valoarea constantei de cuplaj geminal).

Concluzii:

- Sinteza S-alchil-L-cisteinelor decurge respectând următoarele condiții de reacție:
 - în mediu de reacție alcoolic și o prealabilă alcalinizare a mediului cu NaOH 2n;
 - pH slab acid (pH=5.5) realizat cu ajutorul unei soluții de CH_3COOH glacial
 - temperatura care este un factor decisiv în obținerea produșilor S-alchil-L(+)-cisteinelor, este necesar să fie menținută la valori sub $50\text{ }^\circ\text{C}$
 - necesitatea menținerii unui exces de halogenură de alchil față de cisteină
 - randamentele se situează la valori cuprinse între 43 - 56%
 - S-alchil-L(+)-cisteinele se prezintă , în marea lor majoritate, ca și pulberi albe sau alb-gălbui , cu p.t. cuprinse între $206\text{-}242\text{ }^\circ\text{C}$
 - recristalizările se efectează cu randamente bune ce se situează în jurul valorilor de 82 – 89%.
 - s-au obținut substanțe dextrogire cu unghiuri de rotație specifice aproape similare cu acelor identificate în compușii naturali; deviația unghiurilor față de valoarea regăsită în literatura de specialitate indică prezența și a unei cantități mici de racemic
 - în urma analizei elementale a S-alchil-cisteinelor au rezultat valori apropiate de valorile calculate
 - spectrele IR relevă existența benzilor caracteristice grupărilor COO^- , NH_3^+ (corespunzătoare benzii I și benzii II a aminoacizilor) precum și benzile ce indică prezența grupelor alchil
 - prezența grupelor alchil este confirmată și prin analizele $^1\text{H-RMN}$
- Sinteza S-alchil-L(+)-cisteinsulfoxizilor se realizează respectând următoarele condiții de reacție :
 - mediul de reacție este apos acidulat, cu pH = 4.5-5.5 realizat cu acid acetic
 - menținerea unui mic exces de agent oxidant față de alchilcisteină
 - temperatura de reacție se situează la valoarea maximă de $25\text{ }^\circ\text{C}$
 - randamentele se situează la valori cuprinse între 41 – 56 %

- produşii de reacţie au aspect de pulberi albe mătăsoase
- p.t. se situează la valori mai scăzute decât a precursorilor lor (150-168 °C)
- randamentele recristalizărilor se situează la 85-89%
- analiza elementală a S-alchil-cisteinelor indică valori apropiate de valorile calculate
- spectrele IR relevă existenţa benzilor caracteristice grupărilor COO^- , NH_3^+ (corespunzătoare benzii I şi benzii II a aminoacizilor), benzile ce indică prezenţa grupelor alchil precum şi cele caracteristice sulfoxizilor
- oxidarea sulfului este confirmată şi prin analiza $^1\text{H-RMN}$ determinându-se constante de cuplaj mai mari faţă de cele ale s-alchil-L-cisteinelor coresponzătoare, datorită apariţiei noului centru chiral

Activitatea fiziologică a câtorva din aceşti compuşi a fost testată, şi este prezentată în capitolul 6.

S-Etil-L-Cys Sulfoxid

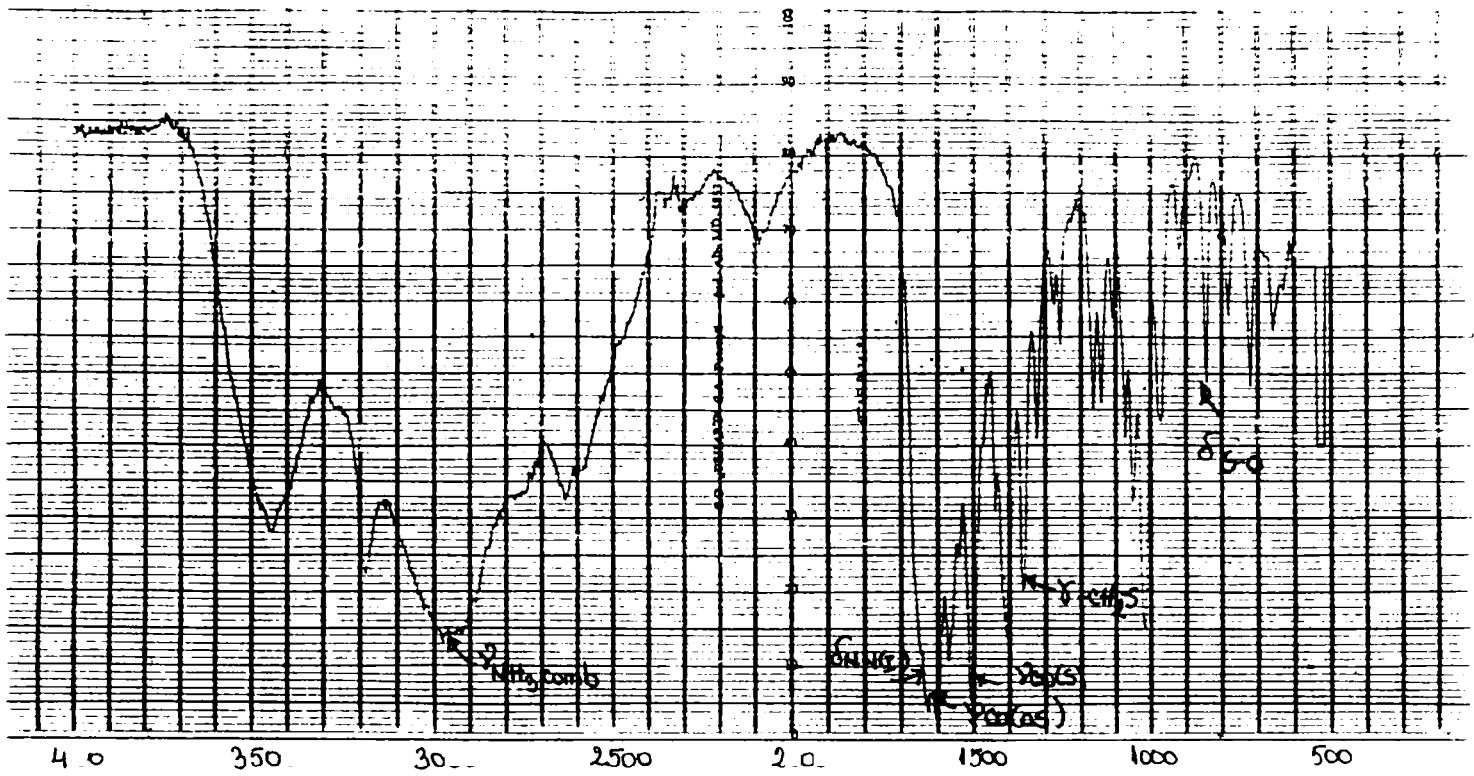


Figura 4.3.1. Spectrul IR al S-etil-L-cistein sulfoxidului

S-Etil-L-Cys

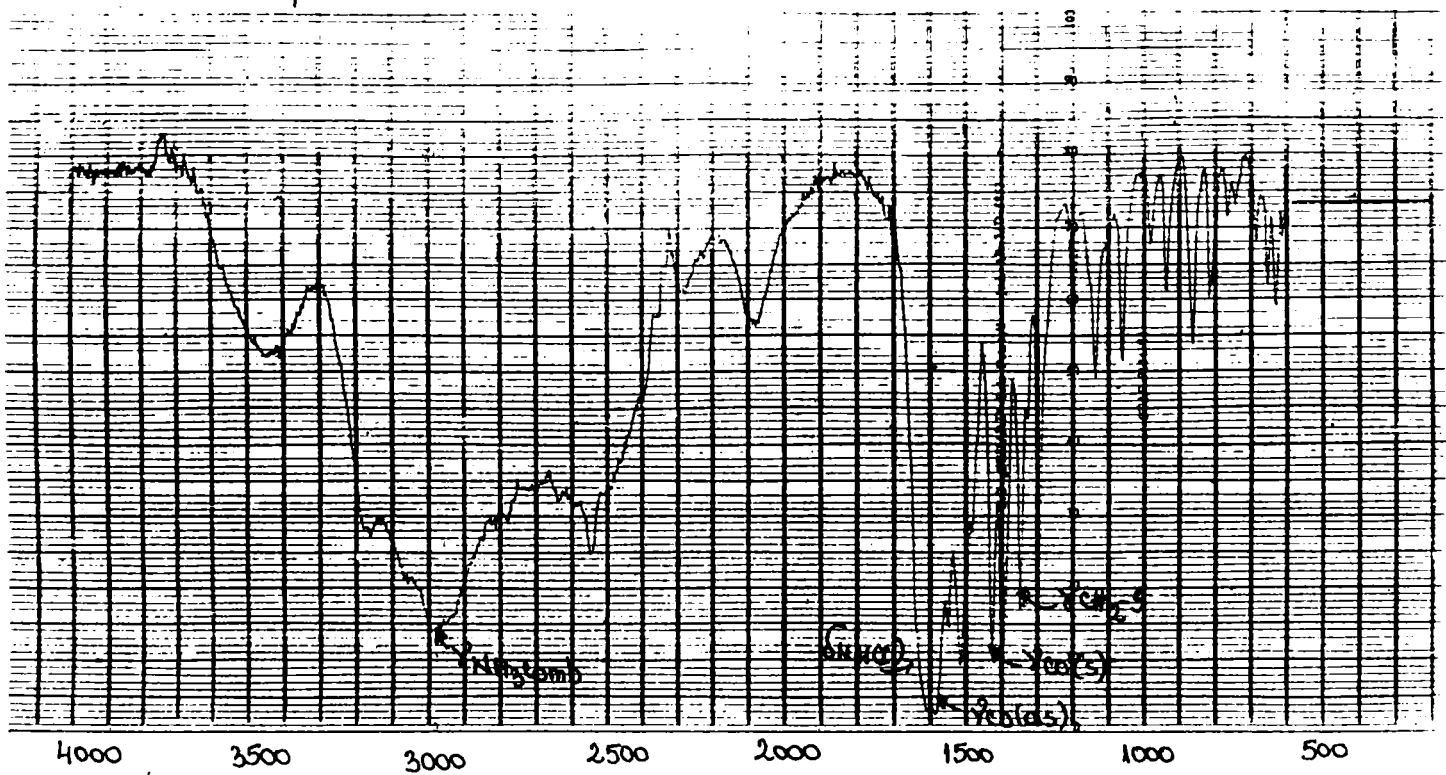


Figura 4.2.1. Spectrul IR al S-etil-L-cisteinei

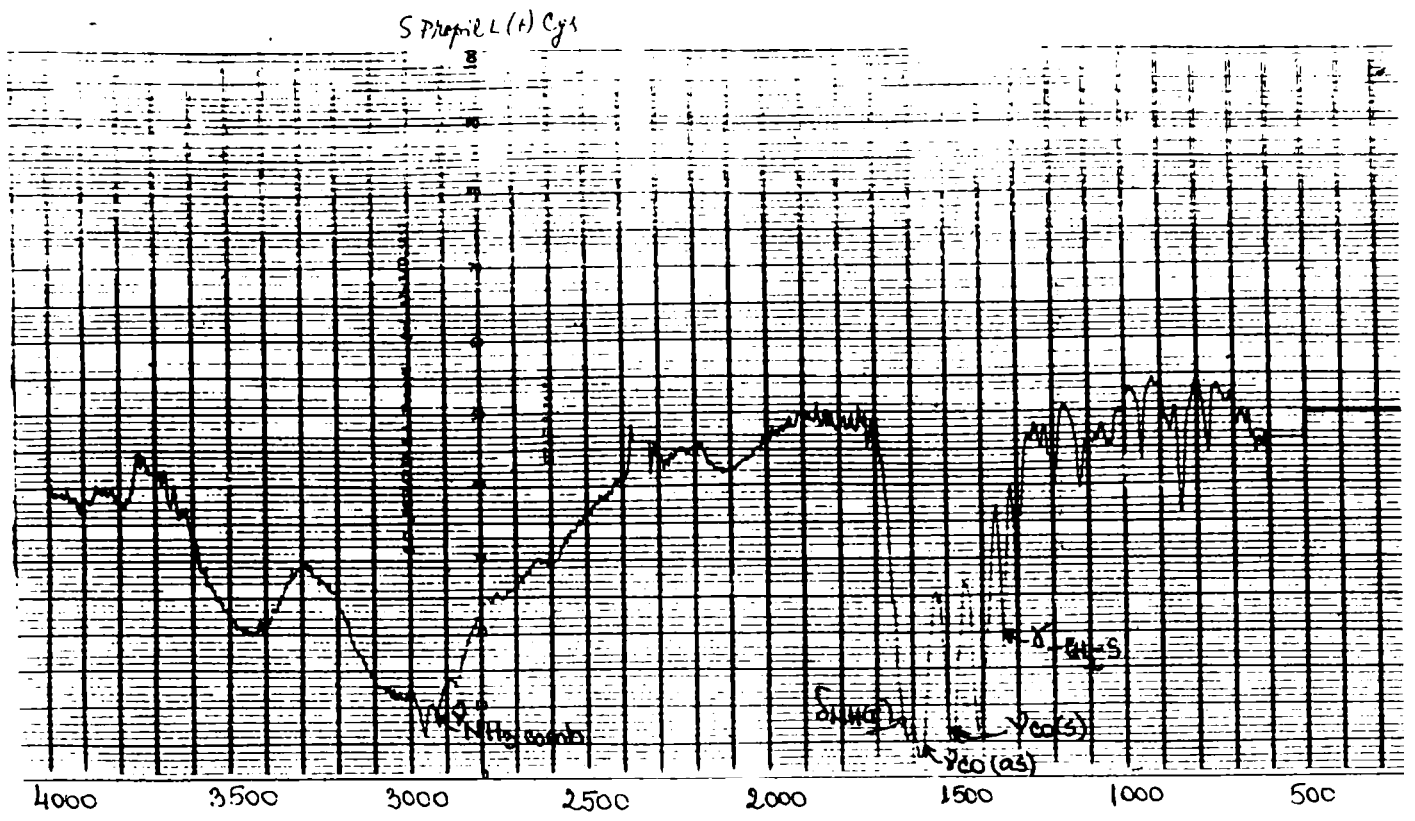


Figura 4.2.2. Spectrul IR al S-propil-L-cisteinei

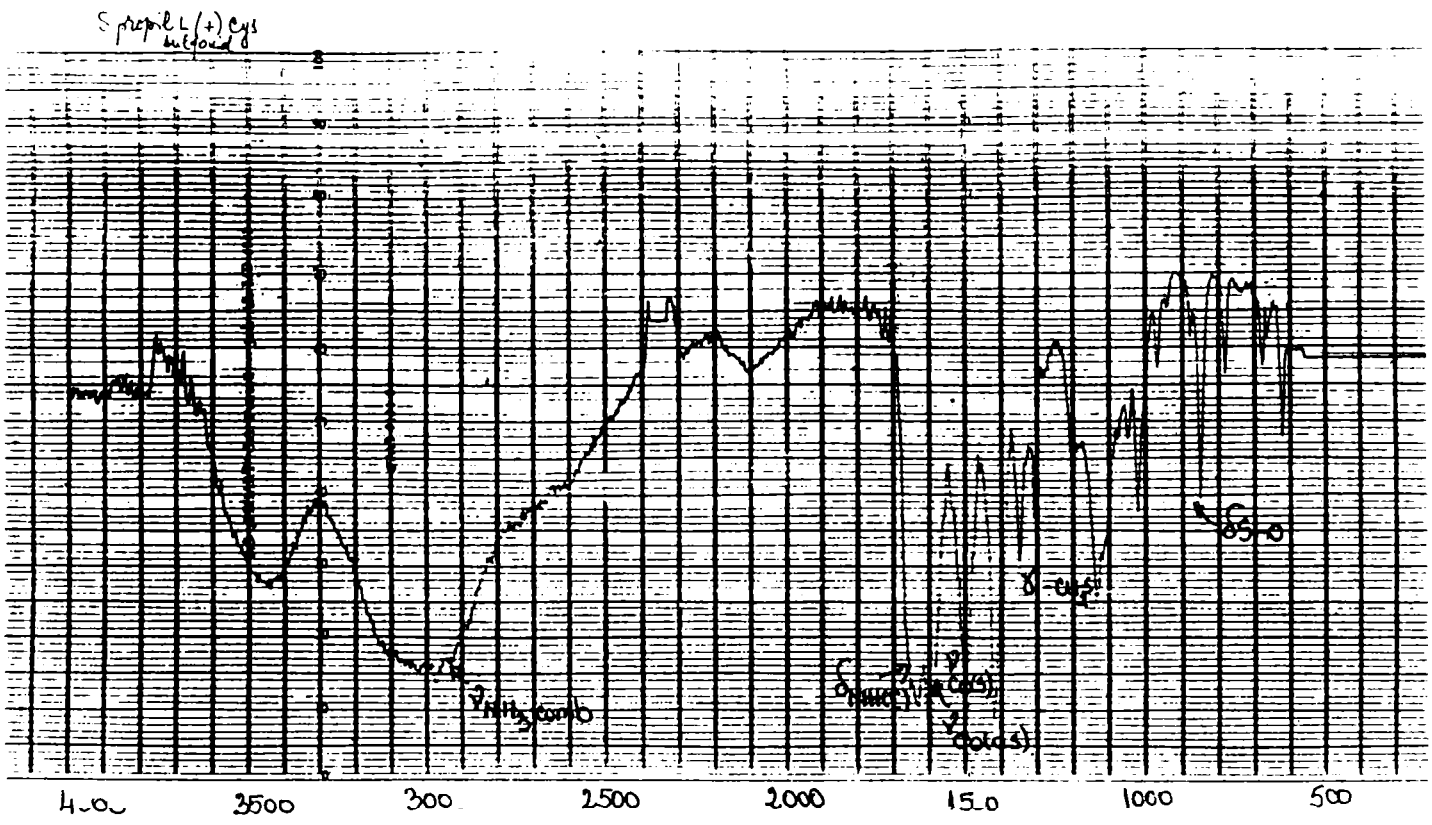


Figura 4.3.2. Spectrul IR al S-propil-L-cistein sulfoxidului

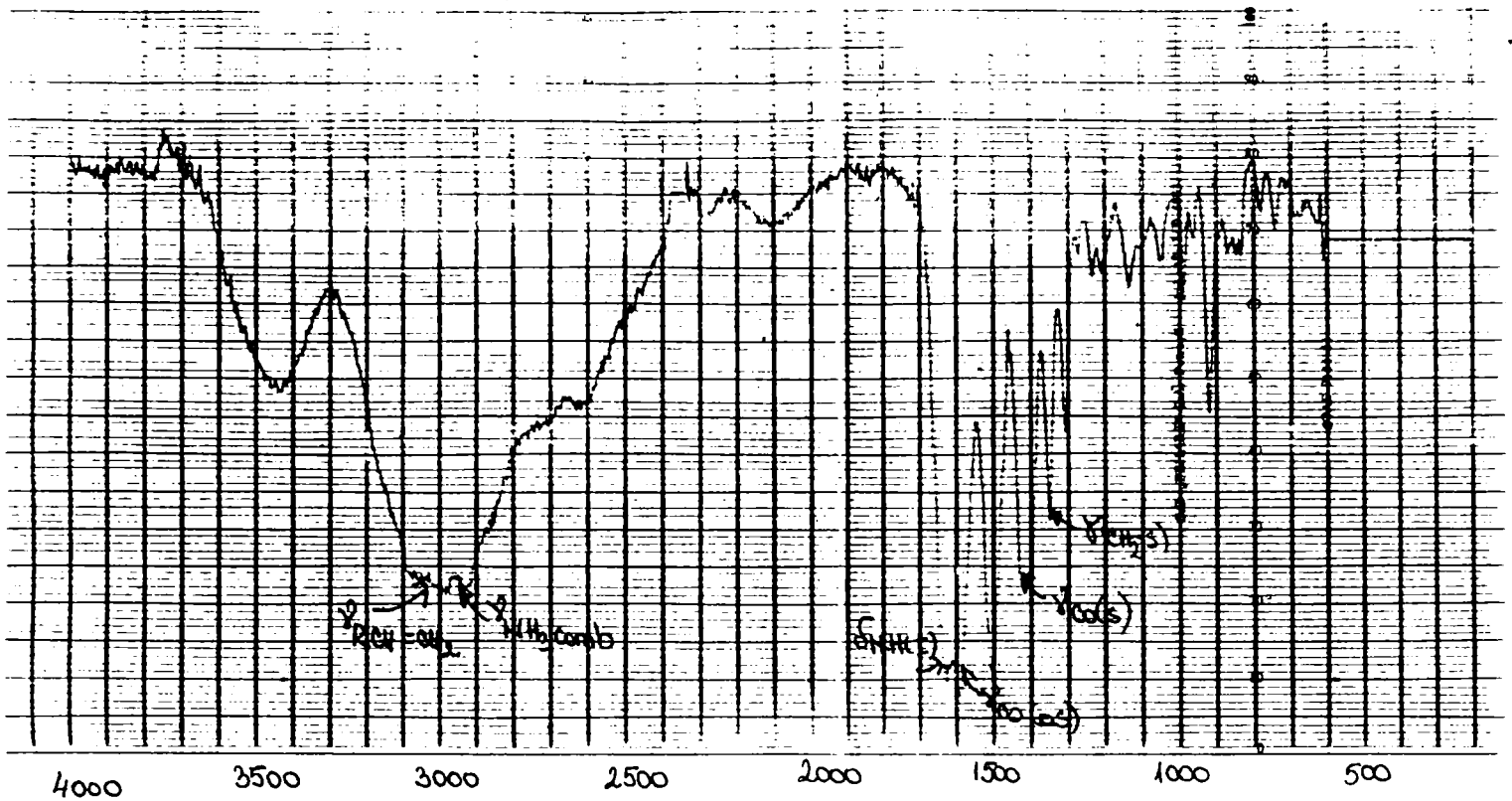


Figura 4.2.3. Spectrul IR al S-alil-L-cisteinei

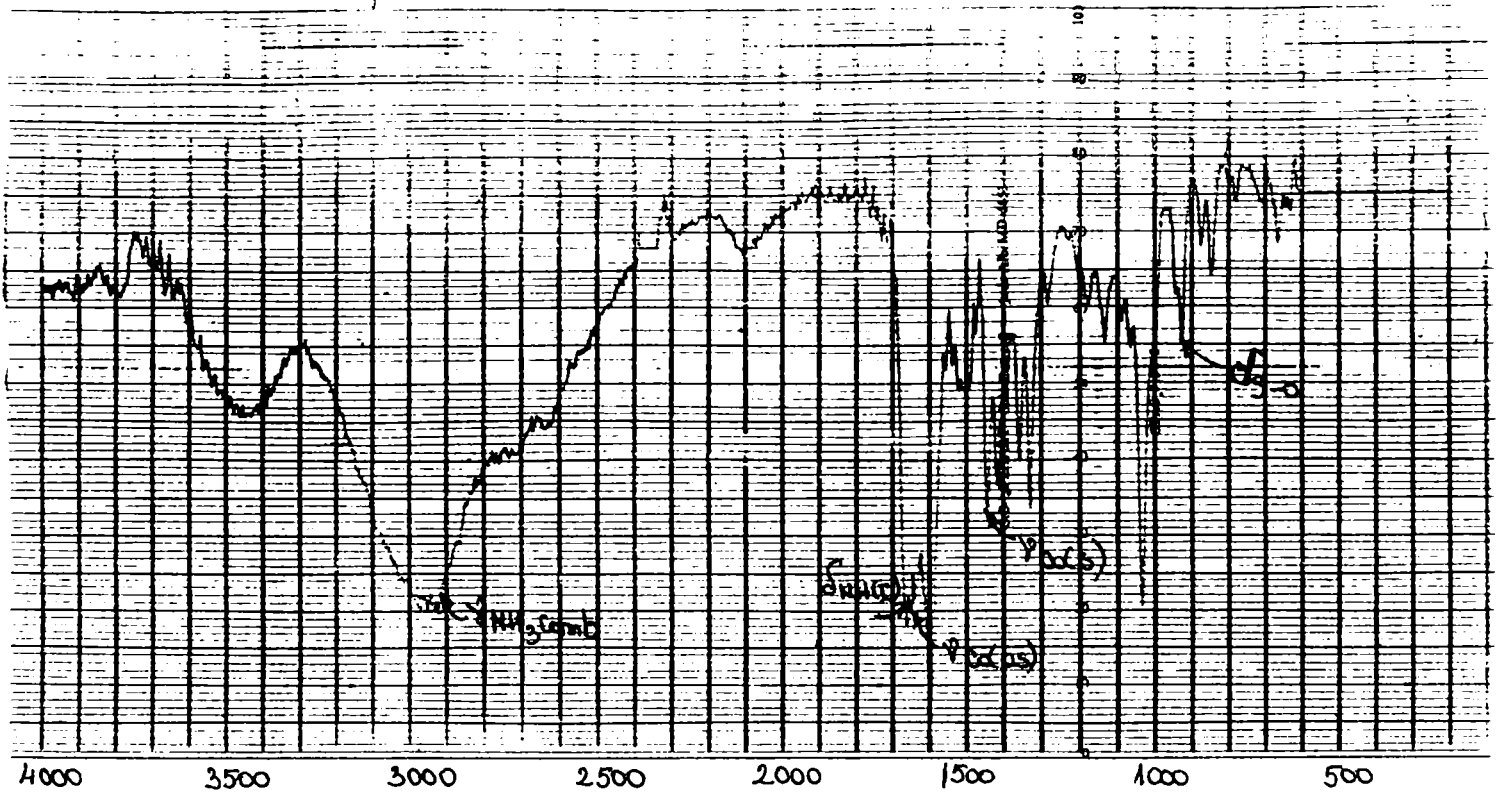


Figura 4.3.3. Spectrul IR al S-alil-L-cistein sulfoxidului

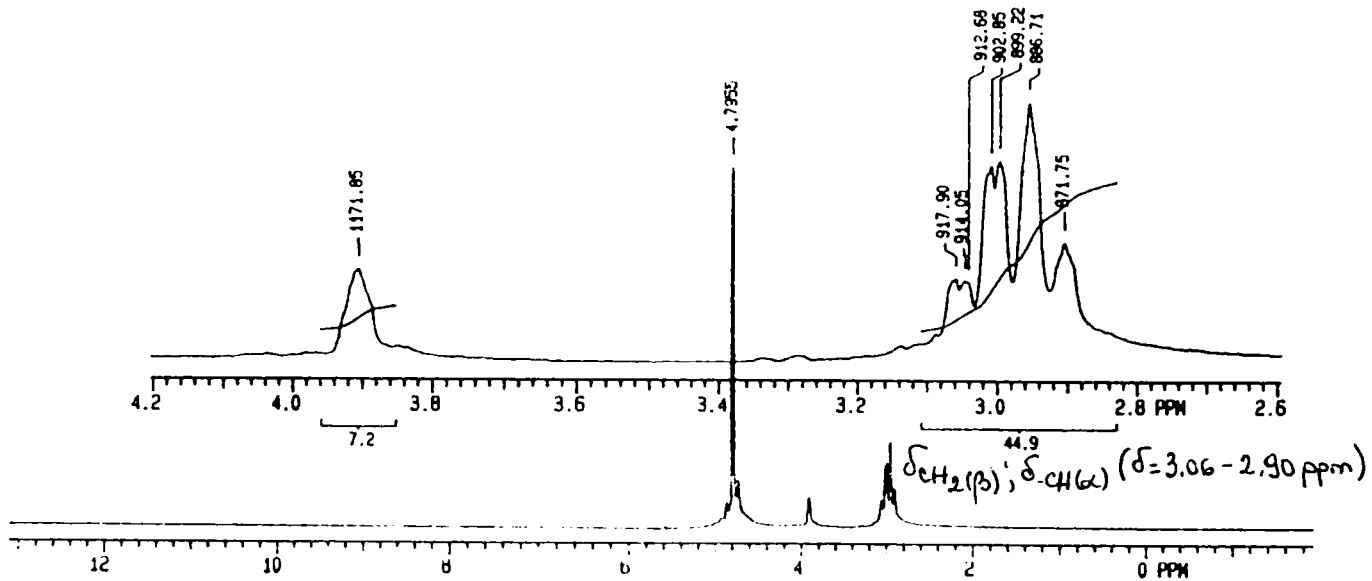


Figura 4.2.4. Spectrul ¹H-RMN al S-etil-L-cisteinei

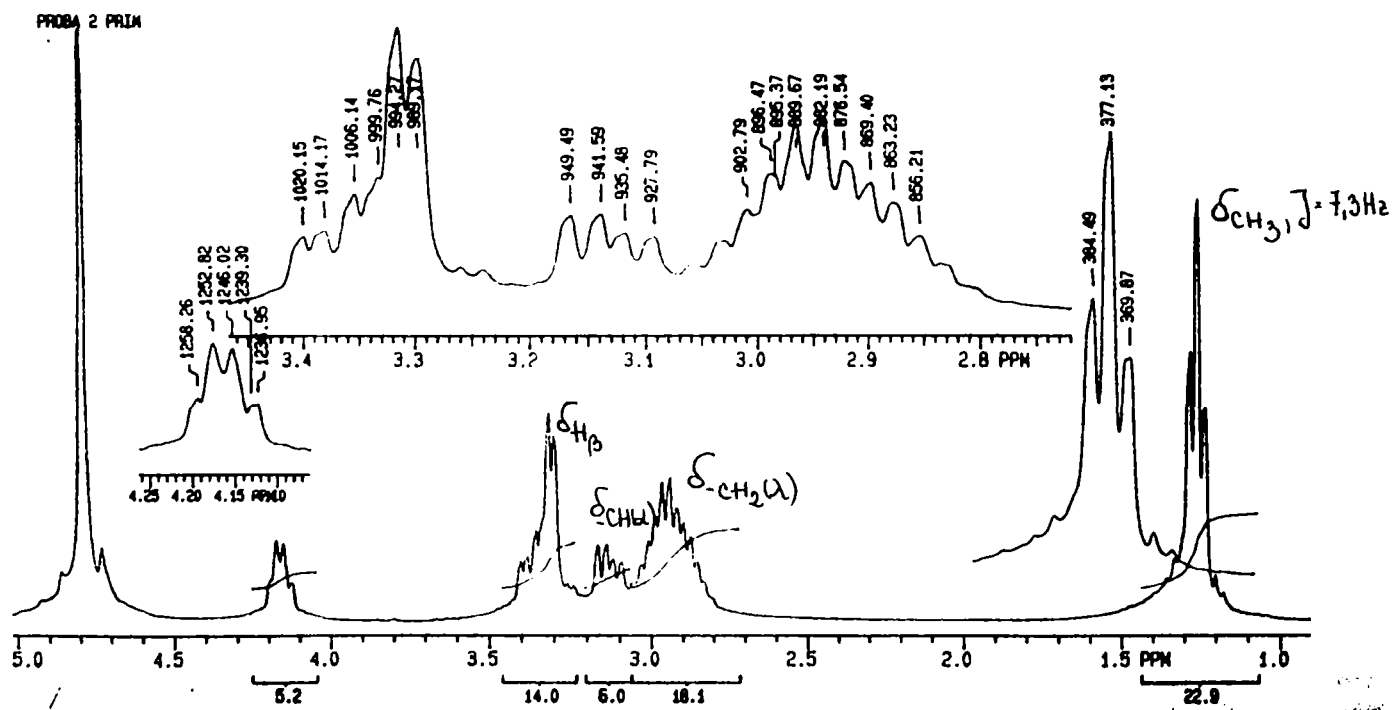


Figura 4.3.4 Spectrul ¹H-RMN al S-etil-L-cistein sulfoxidului

PROBA 3

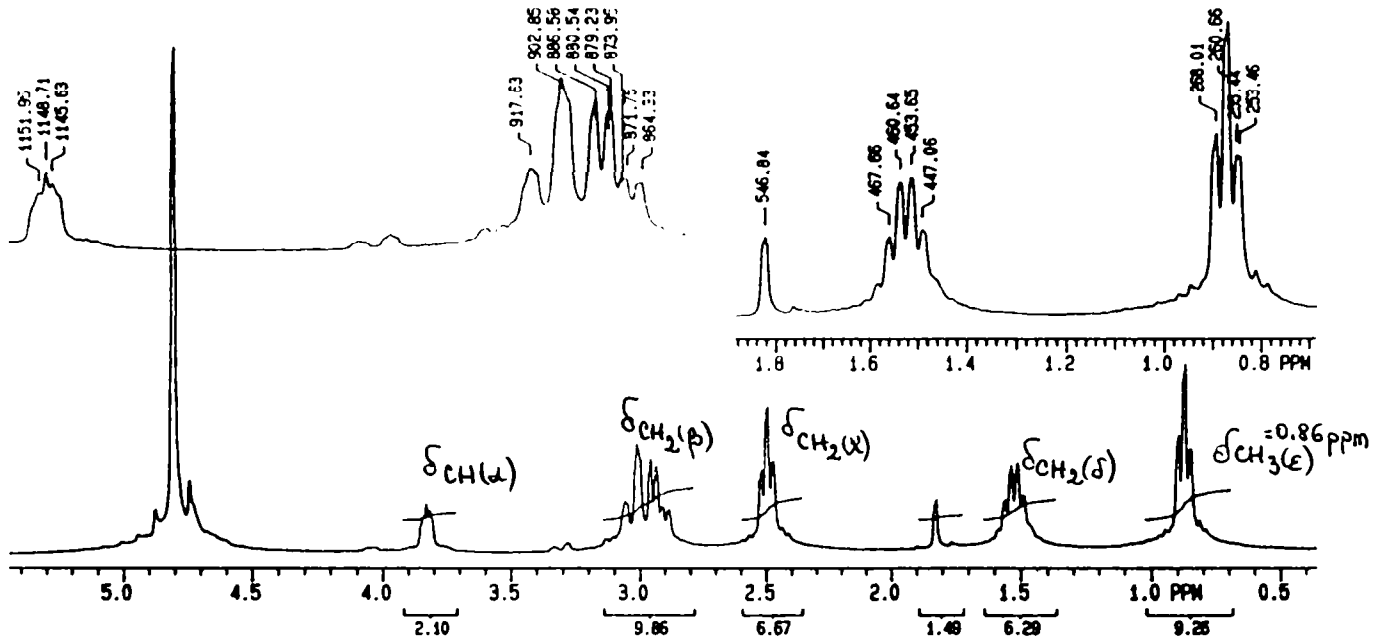


Figura 4.2.5. Spectrul ^1H -RMN al S-propil-L-cisteinei

PROBA 3 PRIM

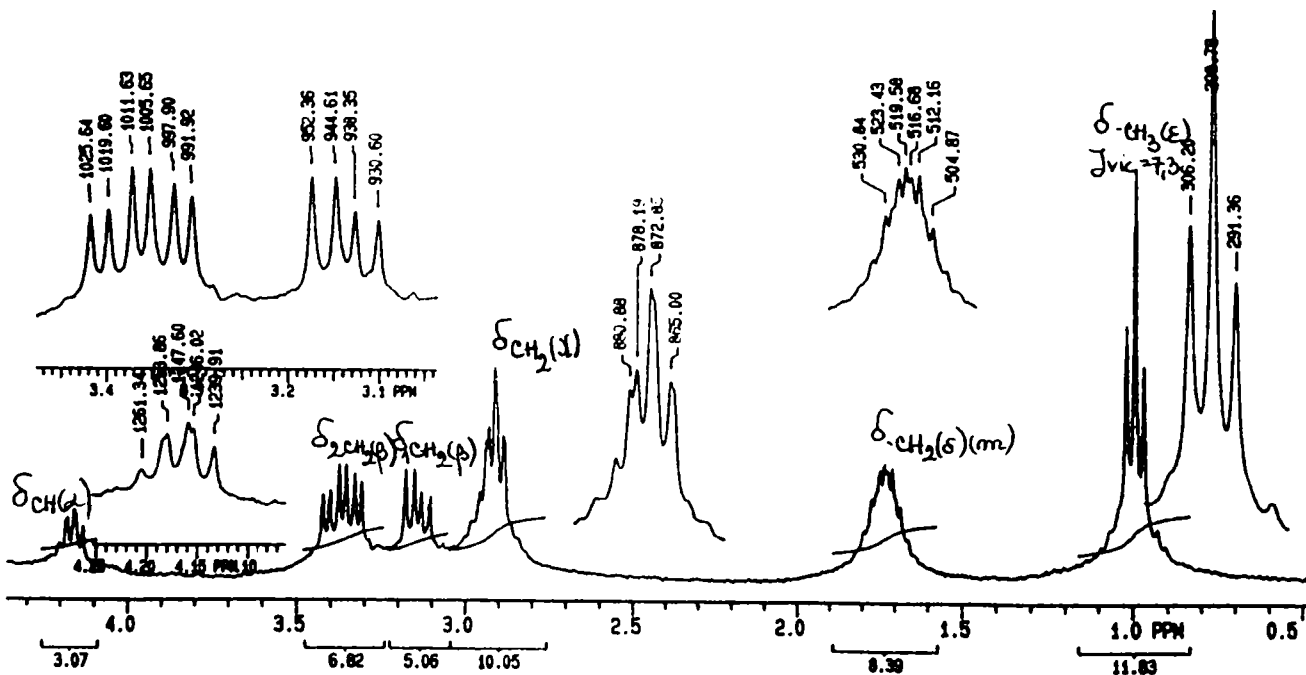


Figura 4.3.5. Spectrul ^1H -RMN al S-propil-L-cistein sulfoxidului

PROBA 6

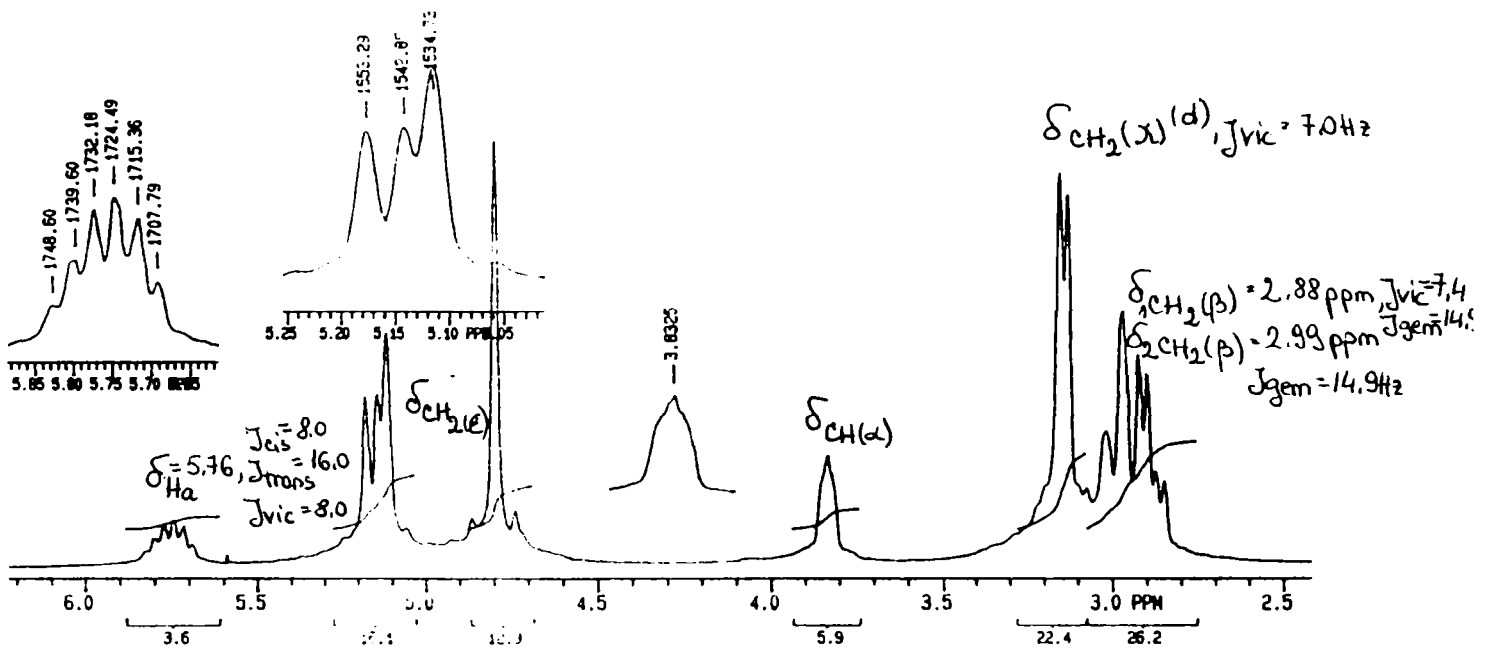


Figura 4.2.6. Spectrul ¹H-RMN al S-alil-L-cisteinei

PROBA 6 PRIM

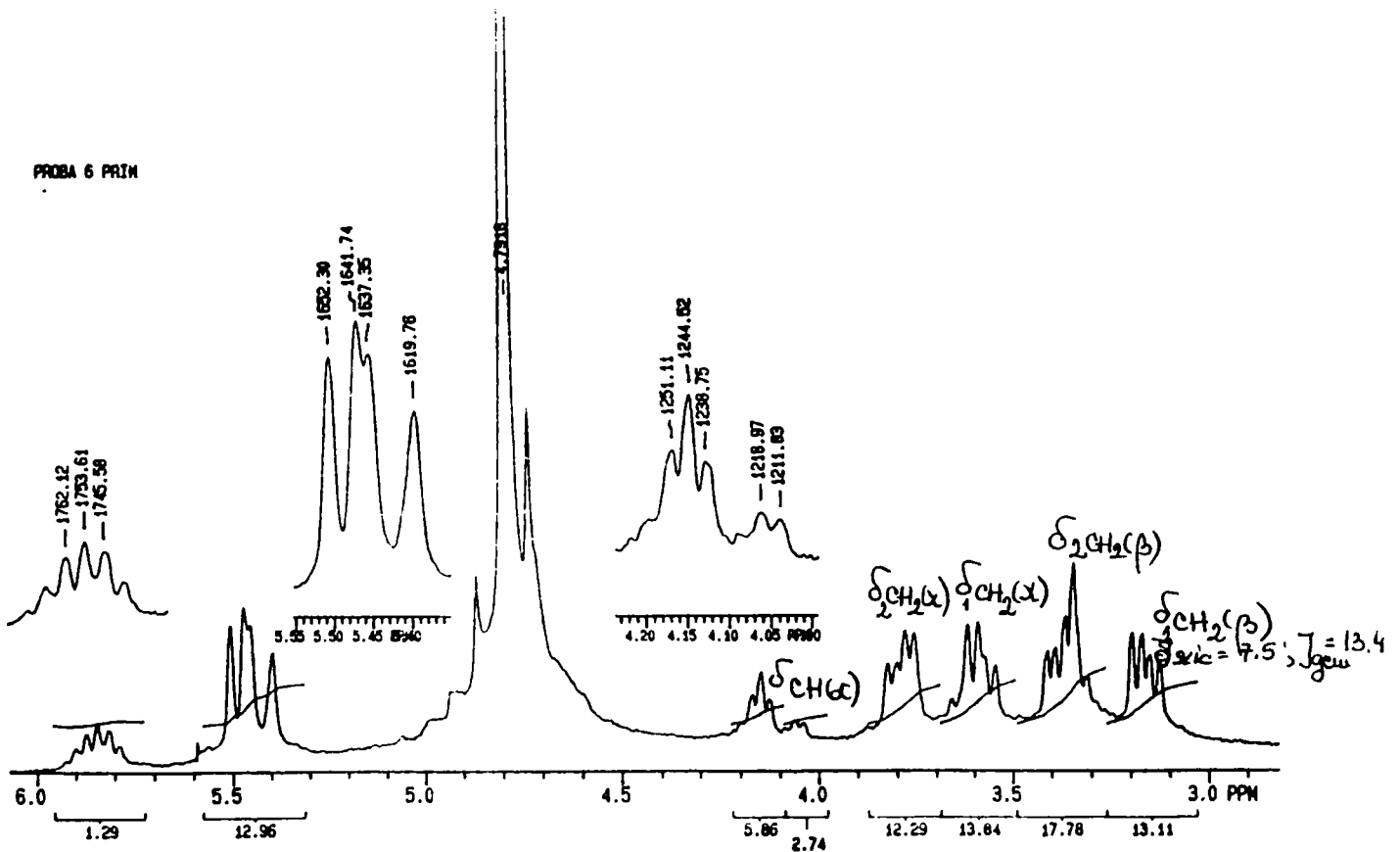


Figura 4.3.6. Spectrul ¹H-RMN al S-alil-L-cistein sulfoxidului

CAPITOLUL 5

SEPARAREA ȘI CARACTERIZAREA ALLINAZEI, ENZIMA CHEIE DIN ALLIUM SATIVUM

Enzimele fiind biocatalizatori de natură proteică se supun aceluiași legi ca și proteinele. Conformația lor activă , specifică unei anumite activități catalitice este rezultatul a numeroase interacții. Astfel , dacă în mediul înconjurător apar modificări ale unor parametrii caracteristici activității enzimatică , poate fi posibilă o modificare a conformației enzimei care să conducă la denaturarea acesteia.

Există o serie de parametri , care modificați conduc la inactivarea enzimei respective. Este necesar să se cunoască exact care sunt parametrii optimi de activitate maximă a enzimei . Prin modificarea temperaturii, a pH-ului, a tăriei ionice a mediului în care-și desfășoară enzima reacția, precum și prin introducerea în mediul de reacție a anumitor substanțe, cum ar fi agenții tensioactivi, enzimele pot fi inactivate total sau parțial(86).

Cercetările ce s-au efectuat până în prezent au relevat existența , în specia *Allium* a unei enzime ce face parte din clasa C-S liazelor . Aceasta este prezentă în plante și devine activă numai în momentul distrugerii țesuturilor plantei (50).

Principalul substrat asupra căruia acționează enzima este sulfoxidul S alchil L-cisteinei. Sub acțiunea enzimei se formează acid piruvic și amoniac, dar principalul produs de reacție este alicina, substanță cu binecunoscute proprietăți bactericide.

Datele din literatură privind enzima alinază au fost prezentate în capitolul 2.

În literatura de specialitate s-a relevat că enzima allinază are o masă cuprinsă între 65.000 D și 130.000D . Variația aceasta se presupune a fi funcție de metoda utilizată, respectiv de proveniența geografică a plantei.

În cele ce urmează vor fi prezentate cercetările proprii privind extracția, fracționarea , determinarea masei moleculare , a activității enzimei allinază conținută în usturoiul autohton precum și influența efectorilor asupra comportamentului alinazei.

5.1.1. Separarea enzimei allinaza prin cromatografie pe coloană

Modul de lucru :

Unui extract apos de usturoi din 250g material proaspăt / șarjă, obținut prin omogenizare într-un omogenizator tip Waring, în soluție tampon fosfat NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 0.02M, pH= 7.0 (raportul masă vegetală : soluție tampon = 2:1), s-au adăugat, pentru stabilizarea extractului, 10% glicerină anhidră și 5 % polivinilpirolidonă. Omogenatul a fost filtrat prin două straturi de tifon sterilizat în prealabil.

Filtratul s-a centrifugat la 3500 rot/min timp de 30 minute într-o centrifugă de tip Janetzky , la temperatura de 4°C. Supernatantul (145 ml) s-a saturat cu 31g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ la 35% saturație și s-a agitat ușor timp de 30 minute la 4°C, după care precipitatul obținut a fost resuspendat în 80 ml tampon fosfat NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 0.02M, pH= 7.0, cu 8 ml glicerină anhidră.

S-a trecut apoi la dializa soluției obținute: În 4 săculeți de dializă s-au introdus câte 25 ml din extractul stabilizat. Săculeții de dializă au fost introduși într-un cristalizor ce conținea 2000ml tampon fosfat 0.05M la care au fost adăugate 9.84mg piridoxal 5 fosfat (20 μM), pentru stabilizarea structurii proteinei. Dializa a fost efectuată la temperatura de 4°C timp de 24 ore (instalația a fost montată într-un frigider) ; soluția tampon din cristalizor a fost menținută sub agitare ușoară , pe toată durata dializei.

Dializatul obținut s-a centrifugat din nou la 3500 rot/min la temperatura de 4°C, timp de 30 minute, pentru îndepărtarea materialului insolubil. S-au obținut 95 ml supernatant.

Purificarea și concentrarea dializatului. Pentru o purificare mai avansată și totodată pentru concentrarea acestuia, dializatul a fost trecut pe o coloană cu hidroxilapatită. Aceasta a fost preparată proaspăt în laborator prin metoda elaborată de Tiselius (86).

Metoda separării pe coloană cu hidroxilapatită a fost preferată altor metode pentru faptul că permite concentrarea soluției proteice printr-o operație simplă , evitând astfel operațiile suplimentare de uscare și liofilizare.

Pregătirea coloanei . S-a utilizat o coloană de hidroxilapatită cu dimensiunile de 2.8 x 13 cm. Umplerea coloanei s-a realizat cu mare atenție prin adăugarea și sedimentarea gravitațională treptată a suspensiei de hidroxilapatită, pentru realizarea unui strat de separare cât mai uniform. La partea superioară a coloanei a fost instalat

un rezervor cu soluție tampon fosfat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.3 M (pH = 7) . A fost stabilită rata de filtrare la 16ml/ oră , prin trecerea soluției de tampon fosfat prin coloana căreia i s-a atașat o pompă peristaltică

Mod de lucru: Pe coloană a fost introdus un volum de 10 ml dializat după care acesta a fost eluat cu 100ml soluție din același tampon fosfat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.3 M . Cu ajutorul unui colector automat de fracțiuni s-au colectat fracțiuni a câte 5 ml fiecare, timp de 32 minute. Fiecărei fracțiuni obținute prin eluarea de pe coloana cu hidroxilapatită i s-a determinat conținutul în proteină precum și cel de acid piruvic, ca măsură a activității allinazei.

→ Conținutul în proteină s-a determinat prin metoda Lowry (172) la $\lambda = 660\text{nm}$.

În prealabil s-a efectuat o curbă de etalonare cu albumină serică bovină (1mg/ml);

Mod de lucru: În 10 eprubete s-au pipetat în următoarea ordine: 0.1, 0.2, 0.3....1.0ml soluție etalon de proteină și apoi în aceeași ordine 0.9, 0.8,.....,0ml apă distilată. În fiecare eprubetă s-au pipetat câte 1.0ml reactiv alcalin de cupru și s-au lăsat în repaus timp de 10 minute, după care s-au pipetat în fiecare eprubetă câte 3.0 ml reactiv Folin-Ciocalteu diluat; eprubetele s-au agitat energic și au fost incubate timp de 10 minute pe o baie de apă la 50° . După răcire s-a citit densitatea optică la $\lambda = 660\text{nm}$, în cuve de 1 cm.

Valorile densității optice în funcție de concentrația albuminei serice bovine sunt redate în tabelul 5.1 și graficul 5.1.

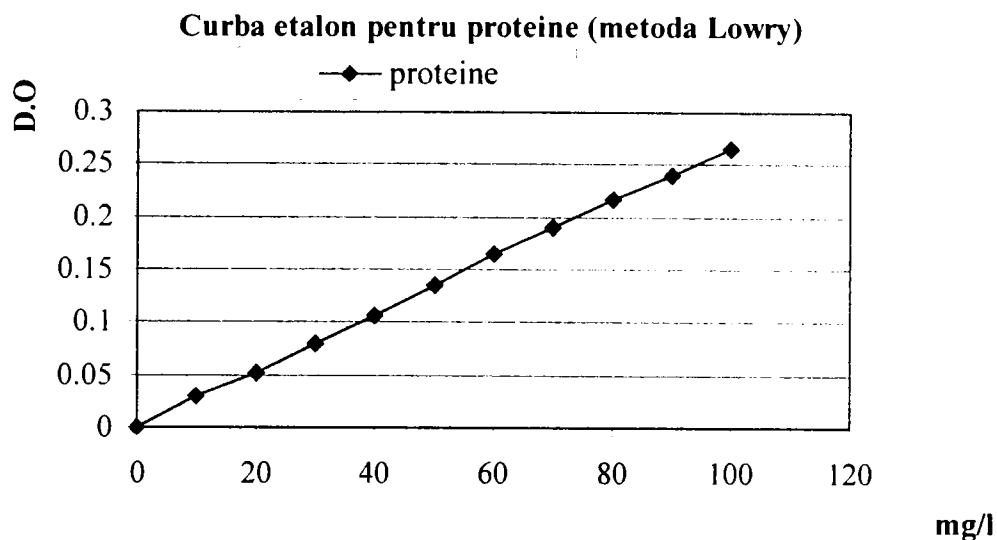
Curba etalon pentru dozarea proteinelor (metoda Lowry)

Tabelul 5.1

Conc. Alb. serice (mg/l)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
D.O. 660nm	0.030	0.052	0.080	0.106	0.135	0.165	0.190	0.217	0.240	0.265

Pentru valorile determinate ale densității optice funcție de concentrațiile diferite ale etalonului , s-a obținut un grad de corelație $r=0.999669$; ecuația de regresie corespunde unei drepte : $y = 0.002672x + 0.000955$

Grafic 5.1



Valorile obținute prin reacția cu reactivul Lowry a fiecărei fracțiuni , în urma eluării dializatului pe coloana cu hidroxilapatită , se regăsesc în tabelul 5.2 și graficul 5.2

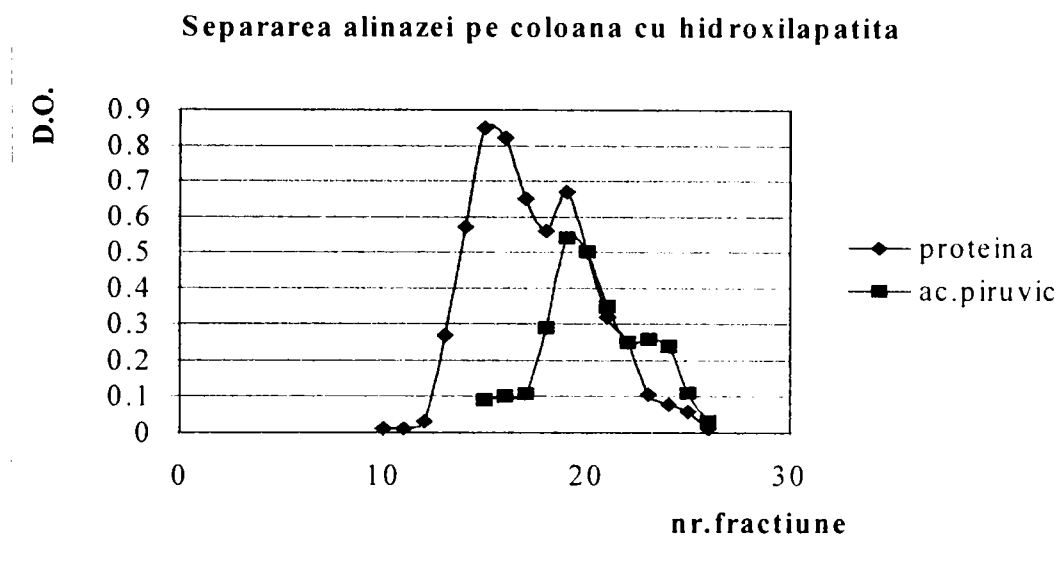
**Concentrația de proteină în fracțiunile obținute prin separare
pe colonă cu hidroxilapatită**

Tabelul 5.2

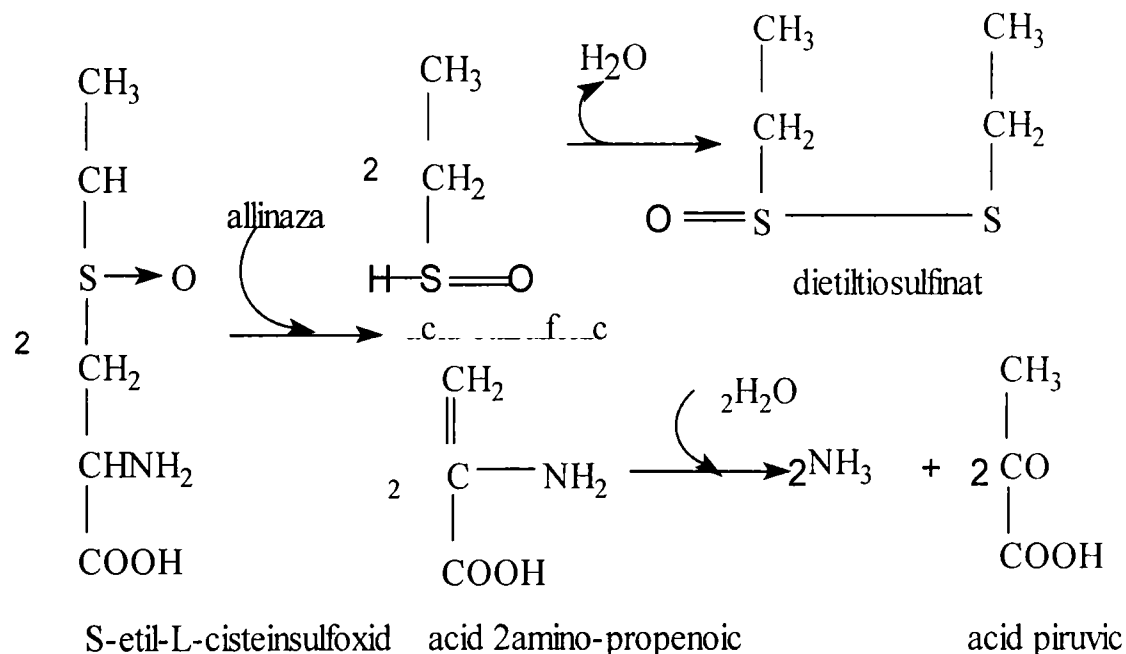
Nr. Fracțiune	mg prot./ 5ml probă	Ac.piruvic mmoli/l	Nr. Fracțiune	mg prot. / 5 ml probă	Ac.piruvic mmoli/l
1-11	sub 1.00	-	21	6.77	10.2
12	1.12	-	22	4.68	6.20
13	5.72	-	23	1.58	5.61
14	11.95	1.45	24	0.14	5.90
15	17.70	1.98	25	0.12	5.45
16	17.08	2.30	26	0.03	2.30
17	13.54	2.41	27	-	-
18	11.66	6.05	.	-	-
19	13.95	11.92	.	-	-
20	10.41	10.8	35	-	-

Așa cum reiese din tabelul 5.2, concentrațiile cele mai mari de proteină s-au înregistrat în fracțiunile 14-20. Acestor fracțiuni li s-a efectuat și determinarea concentrației în enzima allinază , prin determinarea activității acesteia asupra S-etil-L-cistein sulfoxidului, respectiv prin determinarea cantitativă a acidului piruvic eliberat prin reacția enzimatică prezentată mai jos.

Graficul 5.2



Așa cum reiese din tabelul 5.2, concentrațiile cele mai mari de proteină s-au înregistrat în fracțiunile 14-20. Acestor fracțiuni li s-a efectuat și determinarea concentrației în enzima allinază, prin determinarea activității acesteia asupra S-etil-L-cistein sulfoxidului, respectiv prin determinarea cantitativă a acidului piruvic eliberat prin reacția enzimatică prezentată mai jos.



Cea mai activă fracțiune s-a dovedit a fi cea din proba 19 (graficul 5.2), dar o activitate ceva mai redusă a fost prezentă și în fracțiunea 20. Fracțiunile anterioare, deși cu conținut mare în proteină nu au prezentat activitate specifică asupra substratului menționat anterior. Cele două fracțiuni (19 și 20) au fost reunite și au fost supuse în continuare determinării masei moleculare a enzimei. Până la utilizare fracțiunile au fost menținute în frigider, la temperatura de 4°C.

În prealabil s-a realizat o curbă de etalonare a acidului piruvic;

Mod de lucru:

În 8 eprubete s-au pipetat în următoarea ordine: 0.05, 0.1, 0.15, 0.20...0.5ml soluție piruvat de sodiu 2mM și apoi, în aceeași ordine 0.95, 0.90.....0.5 ml apă distilată. În fiecare eprubetă se pipetează apoi câte 1 ml de soluție de 2,4 dinitrofenilhidrazină (1% în HCl) și se lasă să reacționeze timp de 20 minute, după care în fiecare eprubetă se adaugă câte 10 ml de NaOH 0.4n. După 10 minute, au fost efectuate citirile densităților optice față de eprubeta martor fără piruvat, la lungimea de undă de $\lambda=540$ nm.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 5.3 și graficul 5.3.

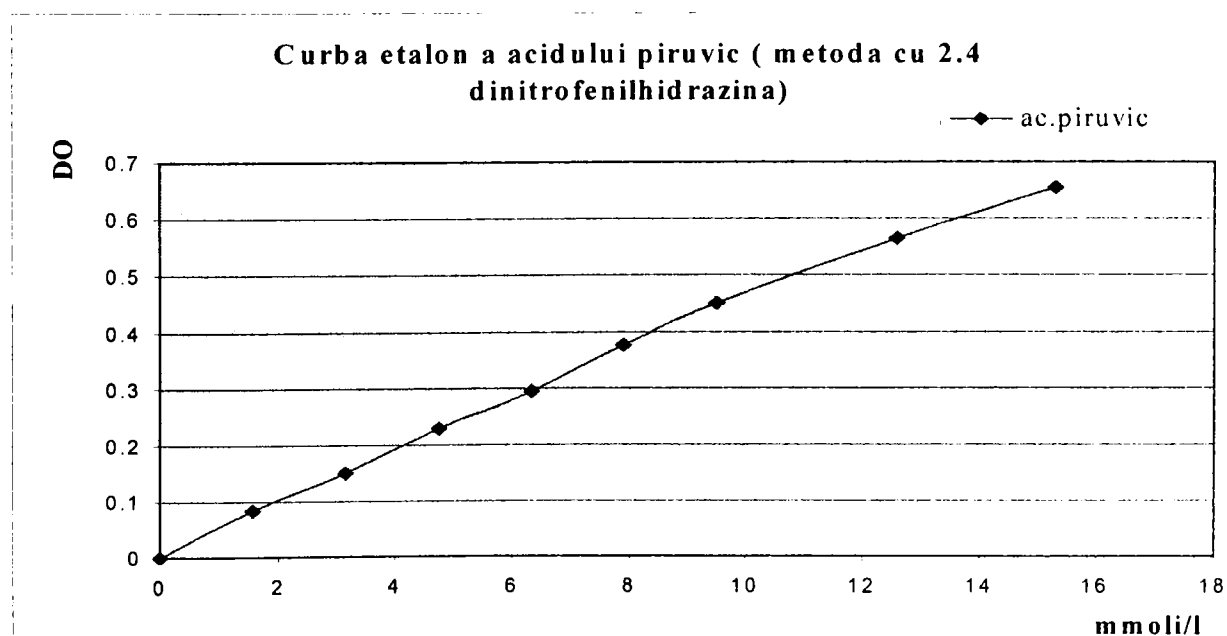
Curba etalon pentru dozarea acidului piruvic

Tabelul 5.3

Nr.crt.	1	2	3	4	5	6	7	8
Acid piruvic mmoli /l	1.58	3.16	4.75	6.33	7.91	9.50	12.6	15.8
D.O ($\lambda = 540\text{nm}$)	0.058	0.151	0.220	0.296	0.366	0.431	0.565	0.685

Pentru valorile determinate ale densității optice funcție de concentrațiile diferite ale etalonului , s-a obținut un grad de corelație $r=0.999488$ iar ecuația de regresie corespunde unei drepte de forma $y=0.004254x + 0.021617$.

Graficul 5.3



Determinarea activității allinazei a fost efectuată prin măsurarea concentrației de acid piruvic cu ajutorul metodei cu 2,4 dinitrofenilhidrazină și s-a realizat astfel:

Mod de lucru:

La 0.5 ml din fiecare fracțiune s-au adăugat 0.5 ml S-etil L-cisteinsulfoxid (40 mM), 0.04 ml piridoxal 5 fosfat (25 μ M) și s-au lăsat să reacționeze timp de 10 minute la temperatura laboratorului, după care reacția enzimatică a fost oprită prin adăugarea a 2 ml de acid tricloracetic (10 %).

Din acest amestec s-au prelevat 0.5 ml probă peste care s-au adăugat 0.5 ml soluție de 2,4 dinitrofenil hidrazină(1% în HCl) și 5 ml NaOH 0.4 n. Se dezvoltă o culoare maro-roșietică ; densitatea optică a probelor s-a determinat la $\lambda=540$ nm față de o probă martor.

5.2. DETERMINAREA MASEI MOLECULARE A ENZIMEI ALINAZĂ PRIN CROMATOGRAFIE DE GEL FILTRARE

5.2.1. Considerații teoretice

Determinarea maselor moleculare a proteinelor se poate realiza prin mai multe metode și anume :

- din date analitice – dacă se cunoaște conținutul procentual al unui rest de aminoacid sau al unui atom metalic(în cazul metaloproteinelor)
- din date de microscopie electronică – prin corelarea dimensiunii imaginii obținute pe placa fotografică și măririle realizate de sistemele optice ale microscopului electronic
- din măsurători de presiune osmotică- se poate aplica numai proteinelor pure, cu mase moleculare foarte mari ,de câteva sute de mii
- prin sedimentare la ultracentrifugare- viteza de sedimentare depinde de masa și forma particulei
- prin gel cromatografie –metoda prezintă avantajul unui timp scurt de determinare și nu necesită ca proteina să fie într-o stare de înaltă puritate, putând fi realizată și în extracte proteice totale.Determinarea maselor moleculare a proteinelor se face corelând valorile maselor moleculare ale proteinelor și comportarea la eluție a acestora.

Witaker (324) a găsit o corelație liniară între logaritmul masei moleculare a proteinelor și raportul dintre volumul de eluție și volumul spațiului gol al coloanei cromatografice V_e/V_0 unde

- V_e este volumul de eluant necesar pentru a transporta moleculele unei anumite substanțe prin coloana cromatografică iar
- V_0 reprezintă volumul de lichid din spațiul interstițial dintre granulele gelului ; acesta se determină experimental cu ajutorul unei substanțe (Blue Dextran 2000) care nu e reținută de materialul stratului cromatografic, prin măsurarea volumului de eluție.

Acest raport V_e/V_0 se mai denumește și volumul relativ de eluție și pare a fi independent de concentrația proteinei aplicate pe coloana cromatografică, de dimensiunile coloanei, dar este afectat valoric de variațiile de temperatură.

Practic se determină volumele de eluție ale unor proteine pure a căror masă moleculară este cunoscută- pentru etalonarea coloanei cromatografice. După determinarea volumului de eluție pentru proteina luată în studiu, prin extrapolare pe curba etalon se realizează determinarea masei moleculare . Andrews (14) și Fischer (105) au realizat evaluarea maselor moleculare a proteinelor în domeniul 1000-80.000. Autorii obțin o curbă sigmoidală în reprezentarea grafică a volumelor de eluție în funcție de logaritmul maselor lor moleculare . Precizia determinării este de 93 %.

5.2.2. Determinarea masei moleculare a enzimei allinaza pe o coloană cu Sephadex G-100.

Allinaza obținută prin concentrarea dializatului pe coloana cu hidroxilapatită , a fost supusă determinării masei moleculare prin cromatografie în gel, pe o coloană umplută cu Sephadex G-100 (acesta a fost ales ca urmare a caracteristicilor sale compatibile cu caracteristicile enzimei allinaza), după o împachetare și standardizare riguroasă a coloanei cromatografice.

Metoda s-a bazat pe determinarea masei moleculare a enzimei comparativ cu volumul de eluție necesar eluării următoarelor substanțe cu mase moleculare cunoscute și care au fost utilizate ca standard (tabelul 5.4).

**Caracteristicile standardelor utilizate pentru determinarea masei
moleculare a alinazei**

Tabelul 5.4

Standard	Furnizor	Masa moleculară (g/mol)
Albumină serică bovină (a)	Sigma (fracțiunea V)	65.000
L-lactat dehidrogenase (b)	Sigma (tip III) bovine heart	130.000
Blue Dextran (c)	Fluka	2.000.000
K ₂ CrO ₄ (d)	Merck	194

. Caracteristicile gelului sunt:

Tip gel	Număr de poruri	Poruri mari (Å)	Poruri mici (Å)	Poruri medii (Å)	Poruri foarte mici (Å)	Poruri foarte mari (Å)	Poruri foarte mici (Å)
Sephadex G-100	40-120	4000-150000	1000-100000	10.0 ± 1.0	15-20	72	5

Pregătirea coloanei cromatografice

S-a utilizat o coloană cromatografică de sticlă de 2.8 x 75 cm, umplută cu Sephadex G-100 . Gelul s-a preparat ținând cont de caracteristicile acestuia.

S-au determinat parametrii ce caracterizează stratul cromatografic , și anume:

Volumul total (V_t) al stratului cromatografic.

Acesta s-a calculat cu ajutorul volumului cilindrului $V = \pi r^2 h$, și s-a determinat experimental , pentru o precizie mai mare a separării.

V_t al gelului determinat prin calcul : $V_t = 461.5 \text{ cm}^3$.

Volumul gelului din strat (V_x) este definit prin relația: $V_x = V_t - V_0$; unde

V₀ (volumul de lichid din spațiul interstițial al gelului) s-a determinat experimental prin eluarea standardului de Blue dextran cu soluție tampon KH₂PO₄/ Na₂HPO₄ 0.05 M (pH = 7), la un debit al eluantului de 55.7 ml/h. S-a obținut o valoare de V₀ = 82 cm³ ; astfel :

$$V_x = 461.5 - 82 = 379.58 \text{ cm}^3$$

Împachetarea coloanei s-a efectuat cu o deosebită grijă pentru a înlătura , pe cât posibil, orice sursă de eroare . Coloana de sticlă a fost conectată la capătul ei superior la un rezervor cu soluție tampon tampon KH₂PO₄/ Na₂HPO₄ 0.05 M (pH =

7) iar la capătul inferior cu o pompă peristaltică. Aceasta din urmă s-a conectat cu un colector automat de fracțiuni.

După împachetarea gelului , întreaga instalație a fost dezaerată cu ajutorul unei soluții de tampon fosfat 0.05M , prin aplicarea unui sens invers eluării imprimat cu ajutorul pompei peristaltice.

Rata filtrării s-a stabilit la 55.7 ml/ oră.

Standardizarea coloanei cromatografice s-a realizat practic prin introducerea pe la capătul superior al coloanei a 5 ml de amestec format din : 35.6mg albumină serică bovină, 3.3mg Blue dextran, 1.6 mg L-lactat dehidrogenază și 4.7mg de K_2CrO_4 solubilizate în soluție de tampon KH_2PO_4/ Na_2HPO_4 0.05 M (pH = 7) .

Aplicarea amestecului s-a realizat cu ajutorul unei seringi cu extrem de mare grijă pentru a nu introduce aer în coloana de gel și a nu perturba suprafața uniformă a acesteia.

S-a efectuat apoi legătura cu rezervorul de soluție de tampon fosfat 0.05M aflat la partea superioară a coloanei și s-a pornit pompa peristaltică a cărei debit a fost prestabilit anterior la 55.7 ml/oră.

Eluarea amestecului s-a efectuat pe parcursul a 8 ore, timp în care a fost colectat un volum de 450 ml de eluent în fracțiuni de câte 3 ml fiecare.

Fiecare fracțiune a fost fotocolorimetrată, determinându-se densitățile optice ale Blue dextranului (c) la 600nm, a proteinelor (a,b) la 660nm (prin metoda Lowry) și a K_2CrO_4 (d) la 440 nm. Valorile densităților optice obținute pentru diferite fracțiuni sunt redate în tabelul 5.6. Din acest tabel se poate observa prezența a patru maxime, care se pot identifica cu prezența celor patru standarde de lucru.

Cele patru maxime corespund următoarelor componente din amestec : fracțiunea 29 - corespunde concentrației maxime a Blue dextranului, fracțiunea 35 – cu o concentrație maximă a L-lactat dehidrogenazei, fracțiunea 44 – cu o concentrație maximă ce corespunde albuminei serice bovine și respectiv fracțiunea 77 – ce corespunde concentrației maxime a cromatului de potasiu.

**Valorile densităților optice ale standardelor de lucru utilizate în separarea
allinazei prin gel cromatografie , pe coloană cu Sephadex G-100**

Tabelul 5.5

Nr. fracțiune	Blue dextran $\lambda=600\text{nm}$	Nr. fracțiune	Proteine $\lambda=660\text{nm}$	Nr. fracțiune	K_2CrO_4 $\lambda=440\text{nm}$
19	0.010	33	0.276	70	0.021
20	0.012	34	0.316	71	0.065
21	0.010	35	0.356	72	0.082
22	0.015	36	0.308	73	0.120
23	0.023	37	0.315	74	0.147
24	0.027	38	0.320	75	0.153
25	0.030	39	0.331	76	0.210
26	0.032	40	0.349	77	0.230
27	0.035	41	0.350	78	0.190
28	0.052	42	0.375	79	0.120
29	0.065	43	0.440	80	0.070
30	0.040	44	0.485		
31	0.030	45	0.480		
32	0.015	46	0.440		
		47	0.410		
		48	0.310		
		49	0.297		
		50	0.225		
		51	0.165		
		52	0.135		
		53	0.105		
		54	0.100		
		55	0.072		
		56	0.060		
		57	0.050		

Volumele de eluție determinate, a fiecărei substanțe standard, sunt următoarele:

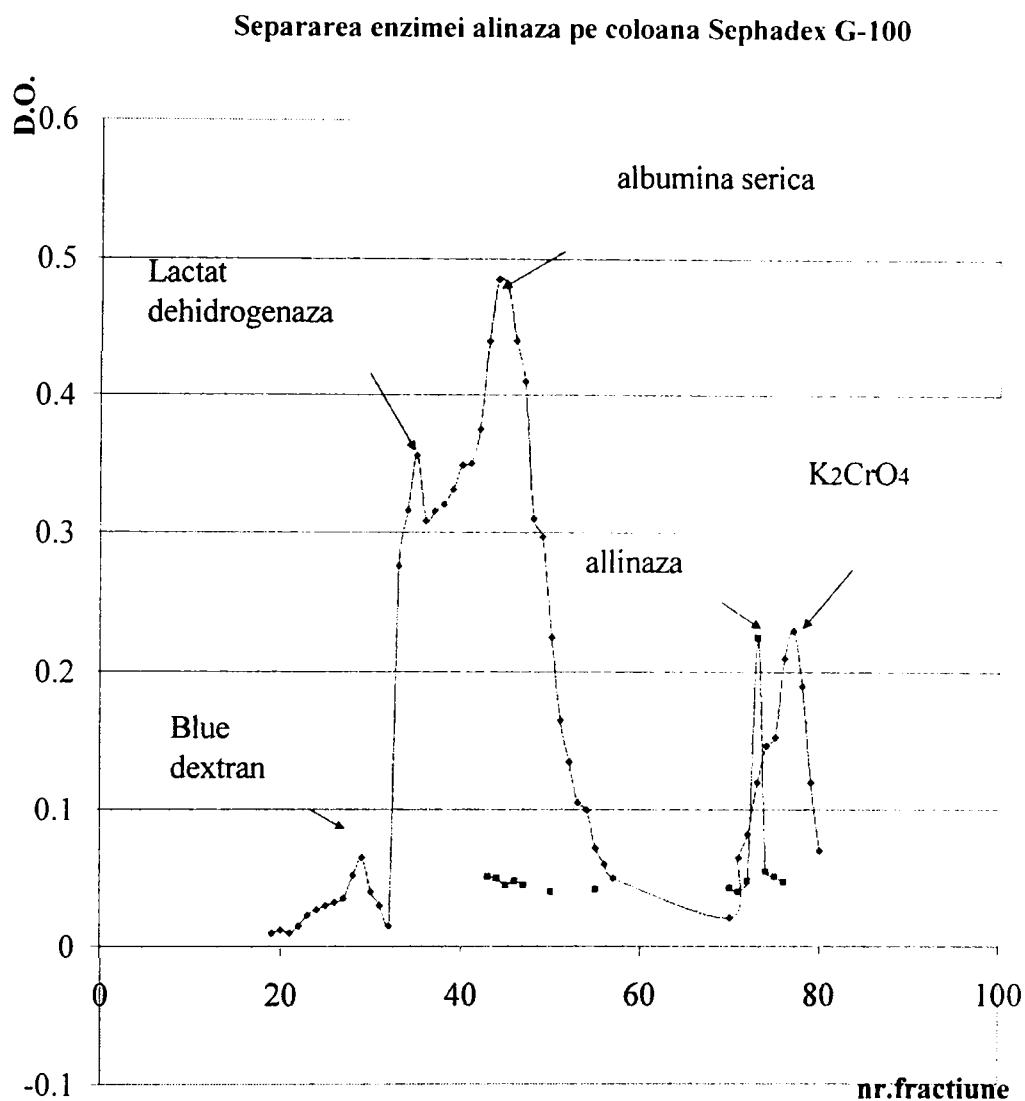
V_e Blue dextran = 82 ml , V_e L-lactat dehidrogenază = 105 ml , V_e albumină serică bovină = 162 ml și V_e K_2CrO_4 = 231 ml.

După determinarea volumelor de eluție a standardelor , coloana cu Sephadex a fost eluată de două ori cu aceeași soluție tampon fosfat 0.05M (pH = 7) cu care s-a efectuat și eluarea standardelor.

Odată coloana pregătită s-a trecut la determinarea masei moleculare a enzimei allinaza, funcție de volumul de eluent utilizat.

**Valorile extincțiilor standardelor de lucru în separarea pe coloană
cromatografică cu Sephadex G-100**

Graficul 5.6



Modul de lucru: S-a preparat un amestec format din fracțiunea 19 (2 ml), obținută după trecerea dializatului de enzimă pe coloana cu hidroxilapatită, (cu un conținut de 13.95 mg proteină /5ml probă și 11.92mmoli/l acid piruvic) în care s-au solubilizat 2.8 mg Blue dextran și 10 mg de K₂CrO₄ .

Amestecul a fost injectat la partea superioară a coloanei , după care s-a trecut la eluarea și identificarea componentelor.

Eluarea s-a realizat timp de 6 ore, cu 315 ml de soluție de tampon fosfat KH₂PO₄/ Na₂HPO₄ 0.05 M (pH = 7), la un debit de 55.7 ml/oră. Cu ajutorul collectorului automat de fracțiuni s-au colectat 105 fracțiuni a câte 3 ml fiecare

Fracțiunilor 30-76, cuprinse între Blue dextran și cromat de potasiu, li s-a analizat conținutul în proteine (respectiv volumul de eluție maxim pentru fiecare

proteină) și s-a identificat prezența enzimei allinaza, prin măsurarea activității acesteia asupra substratului S-etil-L-cisteinsulfoxid; această activitate s-a determinat funcție de cantitatea de acid piruvic eliberat din reacția enzimatică. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 5.6 și graficul 5.6.

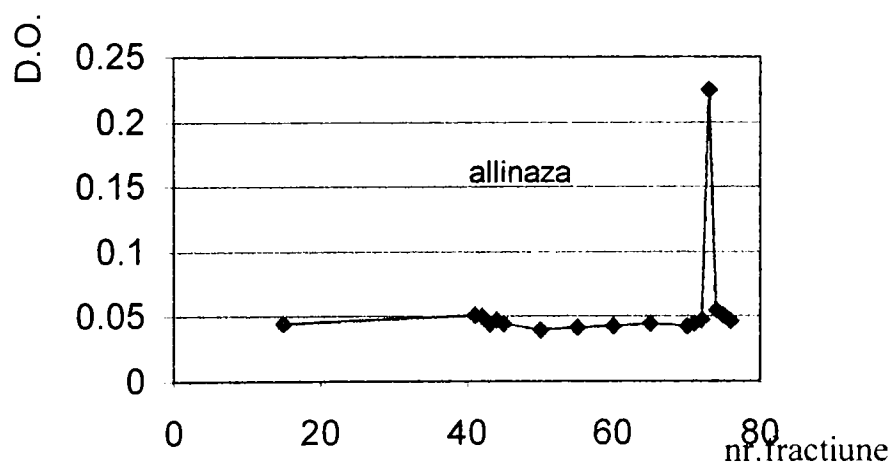
Identificarea prezenței enzimei allinaza, funcție de cantitatea formată de acid piruvic

Tabelul 5.6

Nr. fracțiune	Densitatea optică $\lambda = 540 \text{ nm}$	Nr. fracțiune	Densitatea optică $\lambda = 540 \text{ nm}$
41	0.051	65	0.045
42	0.050	70	0.040
43	0.045	71	0.045
44	0.048	72	0.048
45	0.045	73	0.228
50	0.040	74	0.055
55	0.042	75	0.051
60	0.043	76	0.047

Graficul 5.6

Identificarea prezentei enzimei allinaza în fracțiunile de elutie, pe coloana cu Sephadex G-100



În urma determinărilor efectuate se constată că fracțiunea 73 conține cea mai mare cantitate de allinază. În funcție de volumul de eluție V_e al fiecărui standard, respectiv al allinazei, în urma eluării cu soluție tampon fosfat $\text{NaHPO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 0.05M, de pe coloană ($V_e = 150 \text{ ml}$), și a raportului V_e/V_0 , s-a efectuat determinarea masei moleculare a proteinei din fracțiunea 73, conform metodei de determinare a maselor moleculare ale proteinelor după Fish.

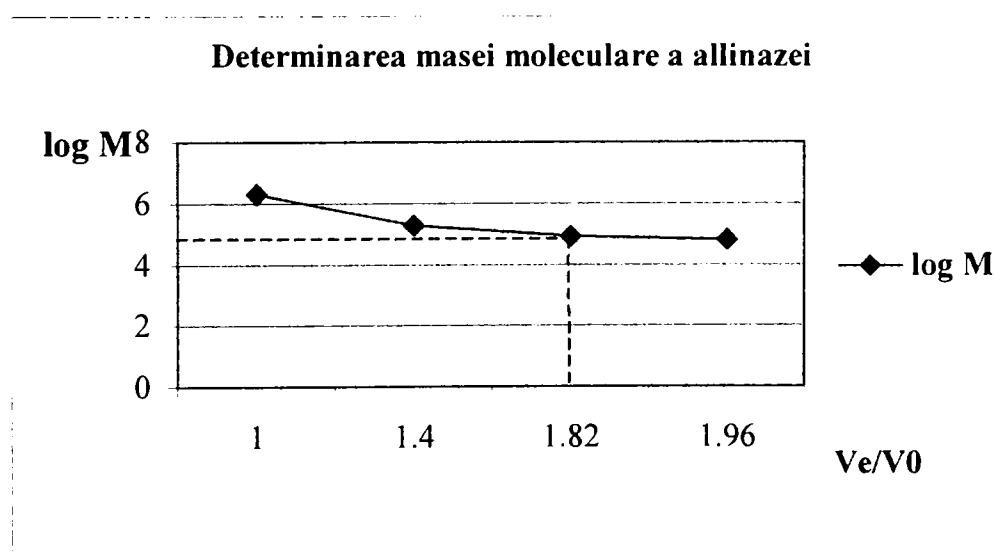
În tabelul 5.7 sunt redată valorile logaritmice ale maselor moleculare a standardelor în funcție de raportul V_e/V_0 , determinat pentru fiecare component în parte în urma eluării componentelor.

Valorile logaritmice ale maselor moleculare ale standardelor

Tabelul 5.7

Standard	V_e ml (pg.95)	V_e/V_0 (pg.93)	Masa moleculară (M)	log M
Blue dextran	82	1	2.000.000	6.301
L-lactat dehidrogenază	105	1.40	130.000	5.11
Albumină serică bovină fract.V	162	1.96	65.000	4.82
allinaza	150	1.82	83.000	4.92

Grafic 5.7



În urma reprezentării grafice s-a determinat masa moleculară a allinazei ca fiind 83.000 , ținând cont că raportul V_e/V_0 al allinazei, în urma eluării pe coloana cu Sephadex G-100 este de 1.82.

Această valoare se situează la valori apropiate găsite în literatura de specialitate ($M = 85.000$) (185, 186).

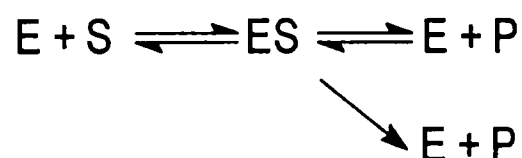
5.3. Determinarea influenței substratului și a efectorilor asupra activității allinazei

Concentrația enzimei și concentrația substratului au un rol primordial în ceea ce privește viteza de desfășurare a reacțiilor enzimatică deoarece în timpul reacțiilor enzimatică are loc formarea unui complex enzimă-substrat.

L. Michaelis și M.Menten au reușit să explice cantitativ fenomenul prin care, în timpul procesului de cataliză, se produce o combinație intermediară nestabilă (complex enzimă-substrat) care apoi se descompune în produs și enzimă, admițând că formarea și descompunerea acesteia au loc după legea acțiunii maselor (86).

Enzimele catalizează numai reacții termodinamic posibile, adică reacții care decurg în sensul micșorării energiei libere a sistemului, rolul complexului enzimă substrat, în procesele de cataliză enzimatică, fiind acela de a micșora energia de activare a reacției.

În funcție de sensul lor de evoluție, reacțiile catalizate de enzime pot fi reversibile sau ireversibile de tipul:



Mecanismul de acțiune al enzimelor și implicit manifestarea funcțiilor catalitice ale acestora pot fi exprimate și interpretate în termeni cinetici.

O reacție biochimică reprezintă un proces dinamic în care, pornindu-se de la o stare, inițială, moleculele reactante sunt transformate ajungându-se la o stare finală.

Acest proces se desfășoară în timp cu o anumită viteză (v).

Viteza de reacție (v), în cazul reacțiilor enzimatică, se definește ca fiind cantitatea de substrat (S) care se transformă în unitatea de timp (t) și se exprimă prin relația: $v = - dS / dt$

Viteza de reacție constituie un parametru de exprimare cantitativă a activității enzimatică.

Concentrația enzimei

În condițiile în care concentrația substratului este constantă, viteza de reacție (v) inițială este direct proporțională, între anumite limite, cu concentrații crescânde ale enzimei $[E]$; peste aceste limite, la concentrații crescute de enzimă viteza de reacție devine însă constantă.

Concentrația substratului. Constanta Michaelis

În condițiile în care concentrația enzimei este menținută constantă, iar concentrația substratului $[S]$ crește, viteza reacției enzimatică variază după o curbă care corespunde unei hiperbole echilaterale ce tinde asimptotic la valoarea maximă a vitezei. Din analiza curbei, rezultă că la o valoare a vitezei de reacție (v) egală cu jumătate din valoarea vitezei maxime de reacție ($v=V_{\max}/2$) corespunde pe axa abscisei, o valoare determinată a concentrației substratului denumită K_m (constanta Michaelis). Deci, constanta Michaelis (K_m) reprezintă acea concentrație de substrat pentru care viteza de reacție corespunde la jumătate din viteza maximă de reacție.

Așadar, pentru $v=V_{\max}/2$, $K_m = [S]$, K_m are valorile unei concentrații, exprimându-se în moli/l.

Afinitatea enzimei pentru substrat. Ecuația Michaelis Menten. (K_m)

Expresia matematică care definește relația cantitativă dintre viteza reacției enzimatică, concentrația substratului, și valoarea K_m și care îndeplinește condițiile unei curbe hiperbolice este ecuația Michaelis - Menten:

$$v = V_{\max} [S] / K_m + [S] \text{ în care:}$$

v = viteza de reacție măsurată; V_{\max} = viteza maximă de reacție corespunzătoare saturării enzimei cu substrat; $[S]$ = concentrația substratului;

Ecuația Michaelis Menten exprimă viteza reacției enzimatică în fiecare moment, viteză care depinde - conform acestei ecuații - de concentrația substratului, viteza maximă de reacție și implicit de concentrația totală a enzimei combinată cu substratul $[E]$ și constanta Michaelis (K_m).

Semnificația K_m . Constanta Michaelis (K_m) reprezintă un indicator al afinității enzimei pentru substratul de reacție: cu cât K_m are o valoare mai mare, cu atât afinitatea enzimei pentru substrat este mai scăzută și invers;

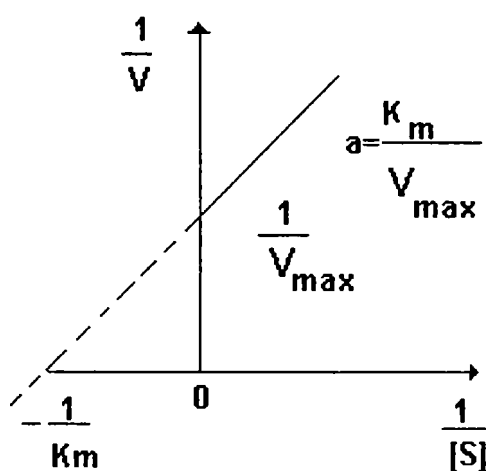
Determinarea experimentală a K_m . Pentru evaluarea mai precisă a K_m s-au elaborat diferite metode grafice prin care cinetica de reacție enzimatică se exprimă sub forma unei drepte.

Cea mai largă aplicabilitate o are metoda Lineweaver – Burk, metoda care se bazează pe exprimarea ecuației Michaelis - Menten într-o altă formulă

matematică ce corespunde unei drepte; prin multiplicarea ambilor termeni ai ecuației $v = V_{\max}[S] / K_m + S$ cu V_{\max} , prin prelucrarea matematică a ecuației și exprimarea valorii reciproce, ecuația Michaelis - Menten devine:

$$1 / v = (K_m / V_{\max})(1 / [S] + 1 / V_{\max}).$$

Aceasta reprezintă ecuația Lineweaver - Burk care, transpusă grafic, are forma unei drepte a cărei ecuație este $y = ax + b$. În ecuația dreptei, y și x sunt cele 2 variabile, a reprezentând panta dreptei, b valoarea punctului de intersecție al dreptei cu ordonata (y).



Reprezentarea grafică a ecuației Lineweaver-Burk

5.3.2. Material și metodă

Determinarea constantei Michaelis (K_m) a allinazei s-a efectuat utilizând ca substrate de reacție diferiți S-alchil-L-cistein sulfoxizi sintetizați de noi în laborator.

S-alchil-L-cistein sulfoxizi utilizați au fost : S-metil-L-cistein sulfoxidul, S-eti-L-cistein sulfoxidul, S-propil-L-cistein sulfoxidul și S-alil-L-cistein sulfoxidul.

Din punct de vedere cinetic, a fost studiată activitatea allinazei, conținută într-un extract apos cu un conținut de 1.54 μ moli tiosulfinați /ml extract, asupra substratelor amintite anterior. Conținutul în tiosulfinați a fost determinată prin metoda Nakata (210)

Mod de lucru:

Într-o eprubetă s-au introdus substrat (în concentrații crescânde, după cum sunt prezentate în tabelul 5.3.1.), 0.5 ml extract iar mediul de reacție utilizat a fost o soluție tampon fosfat 0.01m de pH = 6.5 , până la un volum final de 1.5 ml; eprubetel e se mențin într-o baie de apă la temperatura de 25 °C, timp de 20 minute.

Modul de lucru pentru determinarea activității allinazei, în absența efectorilor

Tabelul 5.3.1.

Probe	1	2	3	4	5	6	7
Substrat ml	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
Extract ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Tampon fosfat 0.01m, pH=6.5	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3
Se incubează la 25 °C timp de 20 minute							

Reacția enzimatică a fost oprită prin adăugarea în fiecare eprubetă a câte 2 ml de acid tricloracetic 10%.

Pe probe alicote s-au efectuat determinările produsului format (acidul piruvic) pentru fiecare concentrație a substratului prin metoda spectrofotometrică cu 2,4 dinitrofenil hidrazină, la 540 nm astfel:

Din fiecare probă s-au luat câte 0.5 ml la care s-au adăugat 0.5 ml de 2,4 dinitrofenil hidrazină și 5ml de NaOH 0.4 n . După 15 minute s-a dezvoltat un complex stabil de culoare roșietică căruia i s-a determinat D.O. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 5.3.2.

5.3.3 Rezultate și discuții

În funcție de concentrația substratului, respectiv a produsului de reacție format, s-a calculat viteza de reacție (tabelul 5.3.3) și s-a reprezentat grafic $v = f([S])$. Din reprezentarea grafică (graficul 5.3.1.) s-a determinat valoarea lui V_{max} pentru fiecare substrat în parte, respectiv s-a putut determina constanta Michaelis (K_m). Valoarea acestei constante ne indică afinitatea enzimei față de substrat.

**Cantitatea de substrat transformat , respectiv de acid piruvic rezultat în
funcție de substratul utilizat**

Tabelul 5.3.2

Substrat	Parametrii	Nr. probe					
		1	2	3	4	5	6
S Metil L (+) Cis Sulfoxid	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	D.O.	0.099	0.180	0.260	0.320	0.350	0.355
	[S] mM/l transformat	4.0	7.8	10.6	14.2	17.0	19.4
S Etil L (+) Cis Sulfoxid	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	D.O.	0.130	0.170	0.200	0.210	0.230	0.240
	[S] mM/l transformat	3.8	7.4	8.8	9.0	9.9	10.2
S Propil L (+) Cis Sulfoxid	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	D.O.	0.080	0.140	0.130	0.132	0.135	0.136
	[S] mM/l transformat	3.4	5.2	5.4	5.5	5.8	5.9
S Alil L (+) Cis Sulfoxid	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	D.O.	0.095	0.180	0.230	0.281	0.280	0.285
	[S] mM/l transformat	3.6	7.9	10.2	11.8	12.2	12.8

Reprezentarea grafică Michaelis Menten a fost realizată , ținându-se cont de valorile determinate experimental ce sunt redate în tabelul 5.3.3.

Constantele Michaelis (Km) obținute pentru fiecare substrat utilizat sunt redate în tabelul 5.3.4 comparativ cu constantele Michaelis redate în literatura de specialitate (185) obținute pentru aceleași substraturi și cu allinaza liofilizată.

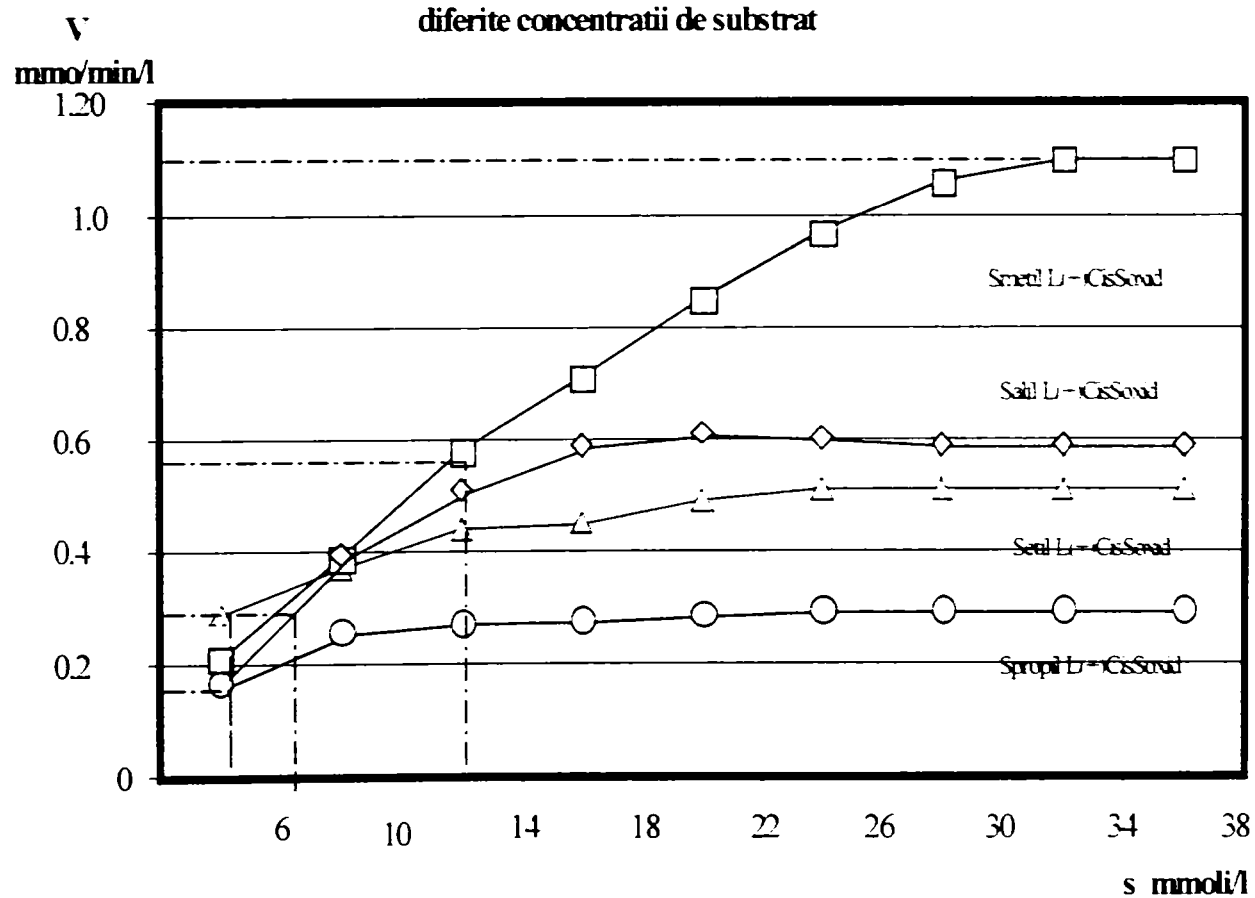
Vitezele de reacție ale enzimei allinaza în funcție de valorile concentrațiilor substraturilor

Tabelul 5.3.3

Concentrația substraturilor [S], mmoli/l	V mmoli/min/l			
	S-Metil-L -(+)-Cis Sulfoxid	S-Etil-L-(+)-Cis Sulfoxid	S-Propil-L-(+)-Cis Sulfoxid	S-Alil-L-(+)-Cis Sulfoxid
4.2	0.21	0.29	0.17	0.18
8.0	0.39	0.37	0.26	0.39
12.0	0.58	0.44	0.275	0.51
16.0	0.71	0.45	0.28	0.59
20.0	0.85	0.49	0.29	0.61
24.0	0.97	0.51	0.295	0.60
32.0	1.06	0.51	0.295	0.59
36.0	1.10	0.51	0.295	0.589
40.0	1.10	0.51	0.295	0.591

Graficul 5.3.1.

Reprezentarea grafica Michaelis-Menten a cineticii enzimatică a allinazei pentru diferite tipuri de S-alkil-L-(+)-cisteinsulfoxizi, la diferite concentrații de substrat



Valorile constantei Michaelis enzimei allinaza în funcție de substratul utilizat

Tabelul 5.3.4

Substratul	Km obținut	Vmax/2 (unități enzimă/mg proteină)	Km literatură (186)	Vmax/2 (unități enzimă/mg proteină)
S-metil-L-(+)-cistein sulfoxid	12.0	58.5	15.0	76
S-etil-L-(+)-cistein sulfoxid	3.40	30.2	6	86
S-propil-L-(+)-cistein sulfoxid	4.20	14	3	30
S-alil-L-(+)-cistein sulfoxid	6.60	26	6	123

Ținând cont de valorile obținute pentru constanta Michaelis , se constată că cea mai mare afinitate o are allinaza , din extractul de *Allium sativum*, pentru sulfoxidul S-etil-L-(+)-cisteinei (Km = 3.40), urmând în ordinea descrescândă a afinității sulfoxidul S-propil-L-(+)-cisteinei (Km = 4.20), sulfoxidul S-alil-L-(+)- cisteinei (Km = 6.60) și sulfoxidul S-metil-L-(+)-cisteinei (Km = 12.0).

Constanta Michaelis a fost determinată pentru fiecare substrat în parte și cu ajutorul reprezentării Lineweaver-Burk; rezultatele sunt prezentate în tabelul 5.3.8. și graficele 5.3.2, 5.3.3 ,5.3.4 și 5.3.5.

În continuare s-a studiat influența a diferiți efectori (activatori și inhibitori) asupra activității enzimei allinaza când aceasta acționează asupra diferitelor tipuri de S alchil L(+) cistein sulfoxizi.

5.3.2. Determinarea influenței unor efectori enzimatici asupra activității enzimei allinaza

Efectorii enzimatici

Efectorii enzimatici sunt substanțe de natură chimică diferită care acționează asupra enzimelor modificând cinetica reacțiilor enzimatice.

După modul lor de acțiune, efectorii enzimatici se clasifică în : activatori, inhibitori, allosterici.

Activatorii enzimatici influențează pozitiv activitatea enzimatică pe care o favorizează sau stimulează. Activatorii enzimatici se prezintă fie sub formă de ioni, care acționează ca activatori propriu-ziși ai unor enzime, fie sub formă de activatori

ai unor proenzime, care acționează prin înlăturarea anumitor fragmente din moleculă sub formă inactivă a unor enzime, transformându-le în forma lor activă ;

- ionii antiinhibitori acționează înlăturând efectul inhibitor al altor ioni;

- substanțe cu caracter reducător acționează prin protejarea grupărilor tiol (-SH) active de la situsul catalitic al enzimelor, grupări necesare pentru activitatea enzimatică.

Inhibitorii enzimatici influențează negativ activitatea enzimatică pe care o pot anula definitiv - ireversibil sau temporar-reversibil. Inhibitorii enzimatici pot afecta fie situsul catalitic, fie oricare altă regiune a moleculei de enzimă, în ambele cazuri legarea substratului fiind influențată (86).

Inhibiția produsă de inhibitorii reversibili poate fi de tip competitiv, necompetitiv și allosterică.

- *Inhibiția competitivă* este determinată de acțiunea inhibitorilor competitivi. Acești inhibitori sunt substanțe care prezintă o analogie structurală cu substratul și care manifestă o anumită afinitate pentru situsul catalitic. În aceste condiții, enzima (E) poate forma complecși intermediari disociabili atât cu substratul de reacție (S) cât și cu inhibitorul competitiv (I_c) :

$E + S \leftrightarrow ES$ și $E + I_c \leftrightarrow EI_c$. Produsul de reacție (P) poate fi însă generat numai de complexul ES: $E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + P$. Prin formarea complexului EI_c se obține, prin blocarea situsurilor catalitice, o reducere a populației de molecule de enzime libere disponibile pentru a reacționa cu substratul ; ca urmare proporția moleculelor de substrat care mai pot fi convertite în produsul de reacție se micșorează considerabil. Inhibiția competitivă poate fi anulată prin creșterea concentrației de substrat, care deplasează astfel inhibitorul competitiv de la situsul catalitic pe care-l ocupă.

- *Inhibiția necompetitivă* este determinată de acțiunea unor inhibitori (I_n) care nu prezintă analogie structurală cu substratul ; aceștia acționează fie asupra enzimei într-o altă regiune a moleculei, diferită de situsul catalitic, formând un complex inactiv enzimă-inhibitor ($E + I_n \leftrightarrow EI_n$), fie asupra complexului enzimă - substrat, formând un complex inactiv enzima - substrat - inhibitor : $ES + I_n \leftrightarrow ESI_n$, fie concomitent asupra enzimei și a complexului ES. În inhibiția necompetitivă se produce o modificare a vitezei maxime de reacție, precum și a valorii K_m , deoarece însăși afinitatea enzimei pentru substrat se modifică.

Tipul de inhibare se poate evidenția și prin reprezentarea grafică Lineweaver-Burk.

În cazul reacției enzimaticе inhibate competitiv, ecuația de conservare arată că enzima se poate afla atât în stare liberă cât și în stare legată în complexele ES și EI

Ținând seama că viteza maximă a reacției este proporțională cu concentrația totală a enzimei de la începutul procesului enzimatic, se poate scrie raportul:

$$v / V_{\max} = \frac{ES}{E + ES + EI}$$

introducând valoarea concentrației complexului EI și explicitând în funcție de v

obținem:

$$v = \frac{V_{\max} \times ES}{E \times ES \times \frac{K_m}{K_i} \times \frac{ES \times I}{S} + V_{\max} \times S} = \frac{V_{\max} \times S}{S \times K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}$$

Comparând ecuația de viteză a reacției enzimaticе în prezența unui inhibitor competitiv cu ecuația Michaelis- Menten, se constată prezența termenului $(1 + I / K_i)$ care multiplică valoarea K_m a enzimei. Se poate considera valoarea K^1_m în prezența inhibitorului competitiv :

$$K^1_m = K_m \times \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \quad \text{astfel:} \quad K_i = \frac{I}{\frac{K^1_m}{K_m} - 1}$$

Unde K_m este valoarea constantei cinetice în lipsa efecteurului negativ.

Când K_i are o valoare mică, dar concentrația inhibitorului este mare, gradul de inhibiție a reacției enzimaticе va fi funcție de concentrația substratului în mediu (332).

5.3.2. Material și metodă

Determinarea constantei Michaelis (K_m) a enzimei allinaza în prezența efecteurilor s-a efectuat utilizând aceleași substraturi de reacție: S-alchil-L-cistein sulfoxizi sintetizați de noi. Efectorii utilizați precum și concentrația lor sunt redade în tabelul 5.3.5

Tipurile de efectori utilizați în determinarea K_m a enzimei allinaza

Tabelul 5.3.5

Efactor	Proveniența	Concentrația	
		moli	g/l
S-Metil-L-(+)-cisteină	Sinteză laborator	1 mM	0.135
S-Etil-L-(+)-cisteină			0.149
S-Propil-L-(+)-cisteină			0.163
S-Alil-L-(+)-cisteină			0.161
L-(+)-cisteină	Merck,p.a		0.121
Acid ascorbic	Fluka, p.a	0.1 mM	17.6

Concentrațiile efectorilor s-au menținut constante.

Schema generală de lucru și condițiile reacției enzimaticice au fost următoarele:

În șapte eprubete s-au introdus: concentrații crescânde de substrat, 0.5 ml extract și 0.1 ml efector . Mediul de reacție utilizat a fost o soluție tampon fosfat 0.01m de pH = 6.5 . Volumul fiecărei probe a fost adus cu soluție tampon, la un volum final de 1.5 ml. Temperatura reacției enzimaticice a fost de 25 °C iar timpul de reacție a fost de 20 minute.

Modul de lucru pentru determinarea activității allinazei, în prezența efectorilor

Tabelul 5.3.6.

Probe	1	2	3	4	5	6	7
Substrat ml	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
Extract ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Efector ml	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Tampon fosfat 0.01m, pH=6.5	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3

Reacția enzimatică a fost oprită prin adăugarea a 2 ml de acid tricloacetic 10%.

Din fiecare probă s-au luat câte 0.5 ml la care s-au adăugat 0.5 ml de 2,4 dinitrofenil hidrazină și 5ml de NaOH 0.4 n . După 15 minute s-a dezvoltat un complex stabil de culoare roșietică .S-au determinat densitățile optice corespunzătoare cantității de acid piruvic obținut în urma reacțiilor enzimaticice în prezența efectorilor prin fotolorimetrare la 540 nm.

5.3.2.2. Rezultate și discuții

Reprezentarea grafică Lineweaver-Burk a fost efectuată atât pentru determinarea constantei Michaelis (K_m) pentru alinază față de fiecare substrat amintit anterior, dar și pentru determinarea influenței unor efectori asupra valorii K_m .

Accastă reprezentare s-a efectuat ținându-se cont de valorile parametrilor obținuți în urma determinărilor cantității de acid piruvic format în urma reacțiilor enzimatic.

S-au obținut următoarele rezultate:

Cantitatea de S Metil L (+) Cis Sulfoxid transformat, respectiv de acid piruvic rezultat, în funcție de efectorul utilizat

Tabelul 5.3.7

Efectori	Parametrii	Nr. probe					
		1	2	3	4	5	6
S Metil L (+) Cisteină	D.O.	0.098	0.170	0.230	0.270	0.300	0.320
	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	[S] mM/l transformat	4.0	7.5	10.1	12.1	13.2	14.2
L -(+)- Cisteină	D.O.	0.090	0.135	0.196	0.252	0.260	0.310
	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	[S] mM/l transformat	3.70	6.06	8.50	11.1	11.4	13.7
Acid asorbic	D.O.	0.200	0.310	0.360	0.370	0.390	0.440
	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	[S] mM/l transformat	8.8	13.7	16.0	16.6	17.2	19.6

Cu valorile obținute s-au efectuat calculele pentru $1/v$ respectiv $1/[S]$, necesare pentru reprezentarea grafică Lineweaver-Burck și a calculului constantelor K_m pentru fiecare efectori în parte.

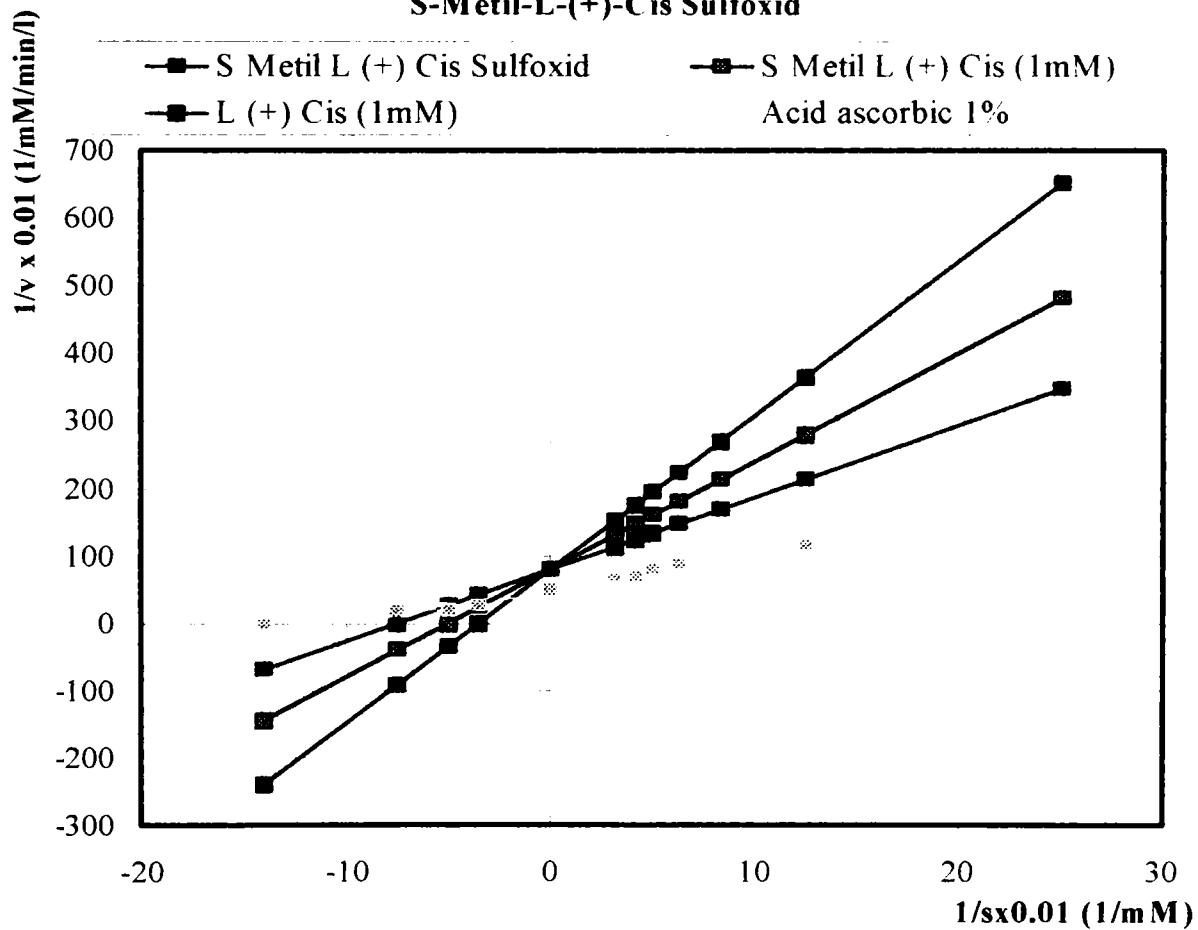
Determinarea constantei Michaelis a enzimei allinaza în funcție de valorile inverse a concentrațiilor S-metil-L-(+)-cistein sulfoxidului $1/[S]$ și a vitezelor de reacție $1/V$, în prezența efectorilor

Tabelul 5.3.8

1/[S] 1/mM x 0.01	1/ V x 0.01 (1/mM/min/l), în prezența			
	Substrat	Efectori		
	S-Metil-L-(+)- Cis Sulfoxid	S-Metil-L-(+)- Cis (1mM)	L-(+)-Cis (1mM)	Acid ascorbic 1%
25	346.6	480	651.4	190
12.5	213.3	280	365	116
8.3	168.5	212.8	269	95
6.2	146.6	180	222	86
5.0	133.3	160	194	78
4.6	124.3	146.5	175	68
3.1	113.3	130	151	66

Graficul 5.3.2.

Reprezentarea Lineweaver-Burk pentru activitatea allinazei asupra S-Metil-L-(+)-Cis Sulfoxid



**Cantitatea de S-Etil-L-(+)-Cis Sulfoxid transformat, respectiv de acid
piruvic rezultat, în funcție de efectorul utilizat**

Tabelul 5.3.9

Efectori	Parametrii	Nr. probe					
		1	2	3	4	5	6
S-etil-L-(+)- Cisteină	D.O.	0.110	0.150	0.190	0.200	0.210	0.230
	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	[S] mM/l transformat	3.9	6.6	8.2	9.0	9.2	10.0
L-(+)- Cisteină	D.O.	0.100	0.140	0.180	0.185	0.200	0.210
	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	[S] mM/l transformat	4.1	6.3	7.6	8.1	8.8	9.3
Acid asorbic	D.O.	0.165	0.210	0.230	0.250	0.252	0.260
	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	[S] mM/l transformat	4.0	7.30	10.1	10.8	11.1	11.4

Cu valorile obținute s-au efectuat calculele pentru $1/v$ respectiv $1/[S]$, necesare pentru reprezentarea grafică Lineweaver-Burck și a calculului constantelor K_m pentru fiecare efectori în parte.

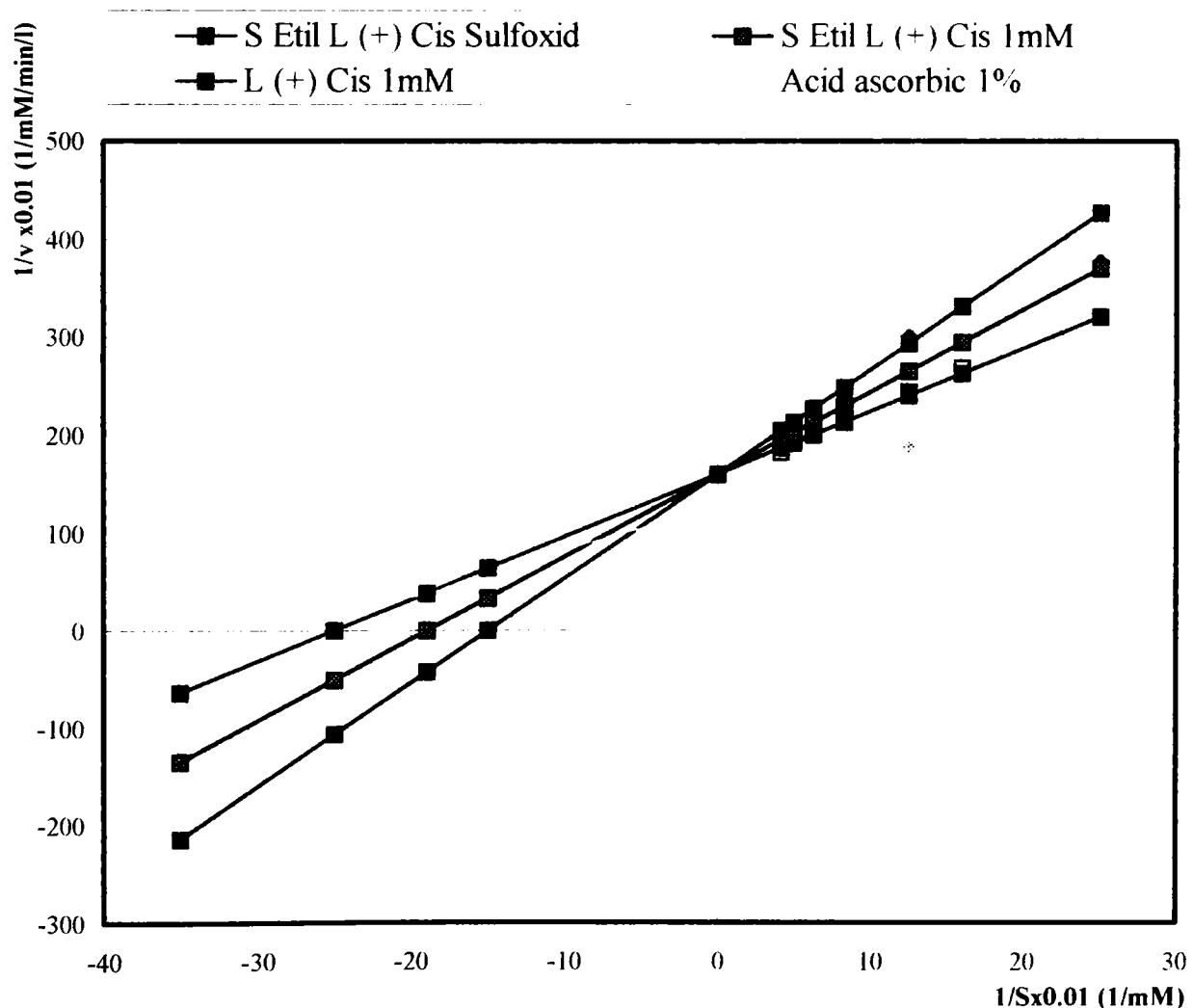
Determinarea constantei Michaelis a enzimei allinaza în funcție de valorile inverse a concentrațiilor S-etil-L-(+)-cistein sulfoxidului $1/[S]$ și a vitezelor de reacție $1/V$, în prezența efectorilor

Tabelul 5.3.10

1/[S] 1/mM x 0.01	1/ V x 0.01(1/mM/min/l), în prezența			
	Substrat	Efectori		
	S-Etil-L-(+)- Cis Sulfoxid	S-Etil-L-(+)-Cis (1mM)	L-(+)-Cis (1mM)	Acid ascorbic 1%
25	320	370	426	254
12.5	262.4	294	330	213
8.3	240	265	293	200
6.25	213	229	248	176
5	200	212	226	168
4.16	192	202	213	162
3.125	186	195	204	151

Graficul 5.3.3

Reprezentarea Lineweaver-Burk pentru S-Etil-L-(+)-Cis Sulfoxid



**Cantitatea de S-Propil-L-(+)-Cis Sulfoxid transformat, respectiv de acid
piruvic rezultat, în funcție de efectorul utilizat**

Tabelul 5.3.11

Efectori	Parametrii	Nr. probe					
		1	2	3	4	5	6
S propil L (+) Cisteină	D.O.	0.060	0.092	0.102	0.120	0.125	0.130
	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	[S] mM/l transformat	2.6	3.92	4.4	5.2	5.4	5.6
L (+) Cisteină	D.O.	0.080	0.095	0.100	0.110	0.120	0.125
	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	[S] mM/l transformat	3.40	4.0	4.2	4.8	5.2	5.9
Acid asorbic	D.O.	0.100	0.125	0.135	0.140	0.144	0.147
	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	[S] mM/l transformat	4.0	5.4	5.9	6.1	6.4	6.7

Cu valorile obținute s-au efectuat calculele pentru $1/v$ respectiv $1/[S]$, necesare pentru reprezentarea grafică Lineweaver-Burck și a calculului constantelor K_m pentru fiecare efectori în parte.

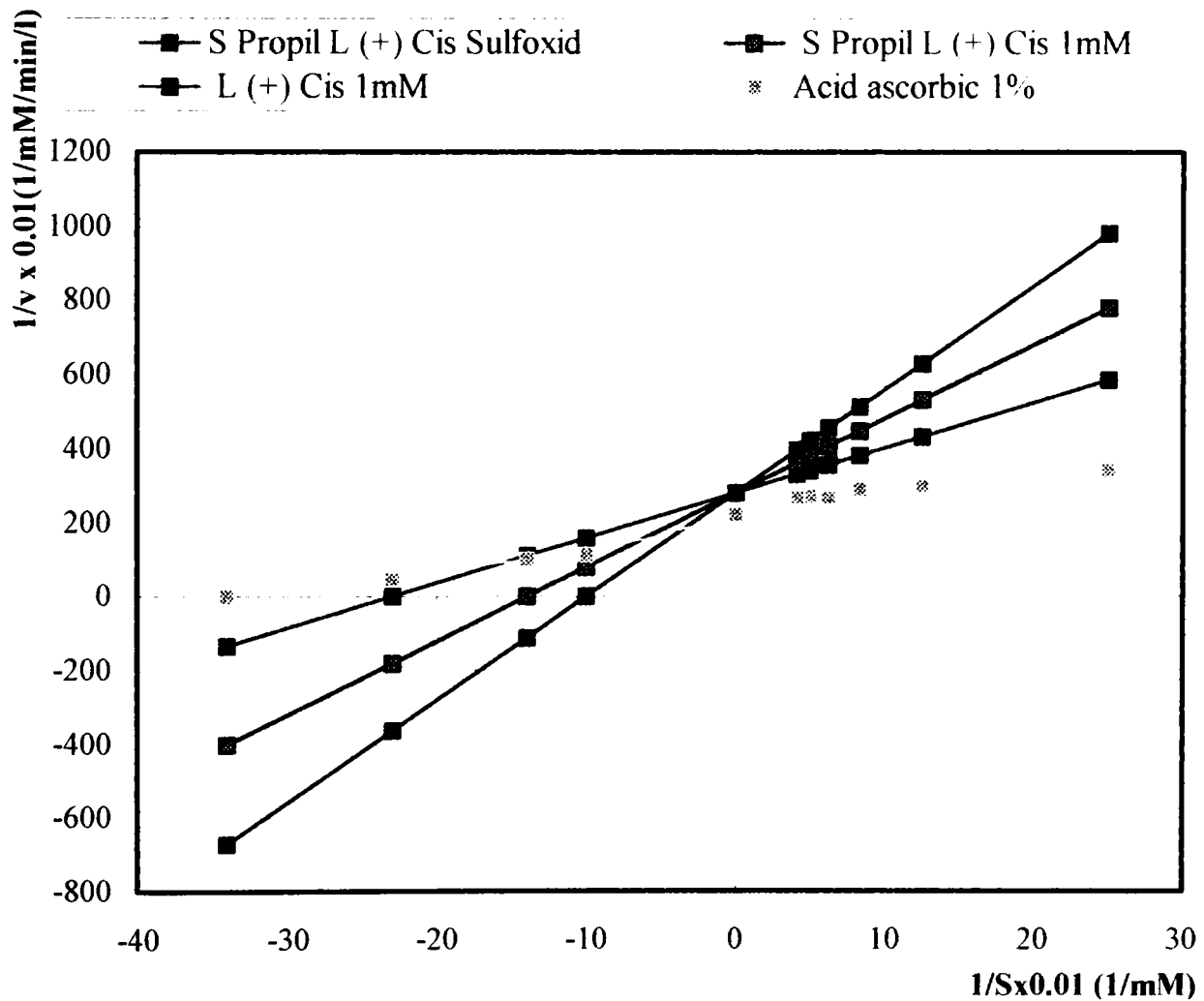
Determinarea constantei Michaelis a enzimei allinaza în funcție de valorile inverse a concentrațiilor S-propil-L-(+)-cistein sulfoxidului $1/[S]$ și a vitezelor de reacție $1/V$, în prezența efectorilor

Tabelul 5.3.12

1/[S] 1/mM x 0.01	1/ V x0.01 (1/mM/min/l), în prezența			
	Substrat	Efectori		
	S-propil-L-(+) Cis Sulfoxid	S-propil-L-(+) Cis (1mM)	L-(+)-Cis (1mM)	Acid ascorbic 1%
25	584	780	980	340
12.5	432	530	630	298
8.3	381	446	512.4	290
6.25	356	405	455	267
5	340	380	420	270
4.16	330	363.2	396.4	267

Graficul 5.3.4

Reprezentarea Lineweaver-Burk pentru S-Propil-L-(+) Cis Sulfoxid



**Cantitatea de S-Alil-L-(+)-Cis Sulfoxid transformat, respectiv de acid
piruvic rezultat, în funcție de efectorul utilizat**

Tabelul 5.3.13

Efactori	Parametrii	Nr. probe					
		1	2	3	4	5	6
S-alil-L-(+) Cisteină	D.O.	0.095	0.150	0.190	0.220	0.247	0.250
	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	[S] mM/l transformat	3.9	6.7	8.2	9.5	10.5	10.8
L-(+)- Cisteină	D.O.	0.085	0.132	0.163	0.204	0.230	0.232
	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	[S] mM/l transformat	3.60	5.8	7.2	9.0	10.0	10.2
Acid asorbic	D.O.	0.202	0.232	0.250	0.260	0.297	0.303
	[S] mM/l	4.2	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
	[S] mM/l transformat	3.4	7.1	11.1	11.6	12.9	13.3

Cu valorile obținute s-au efectuat calculele pentru $1/v$ respectiv $1/[S]$, necesare pentru reprezentarea grafică Lineweaver-Burck și a calculului constantelor K_m pentru fiecare efectori în parte.

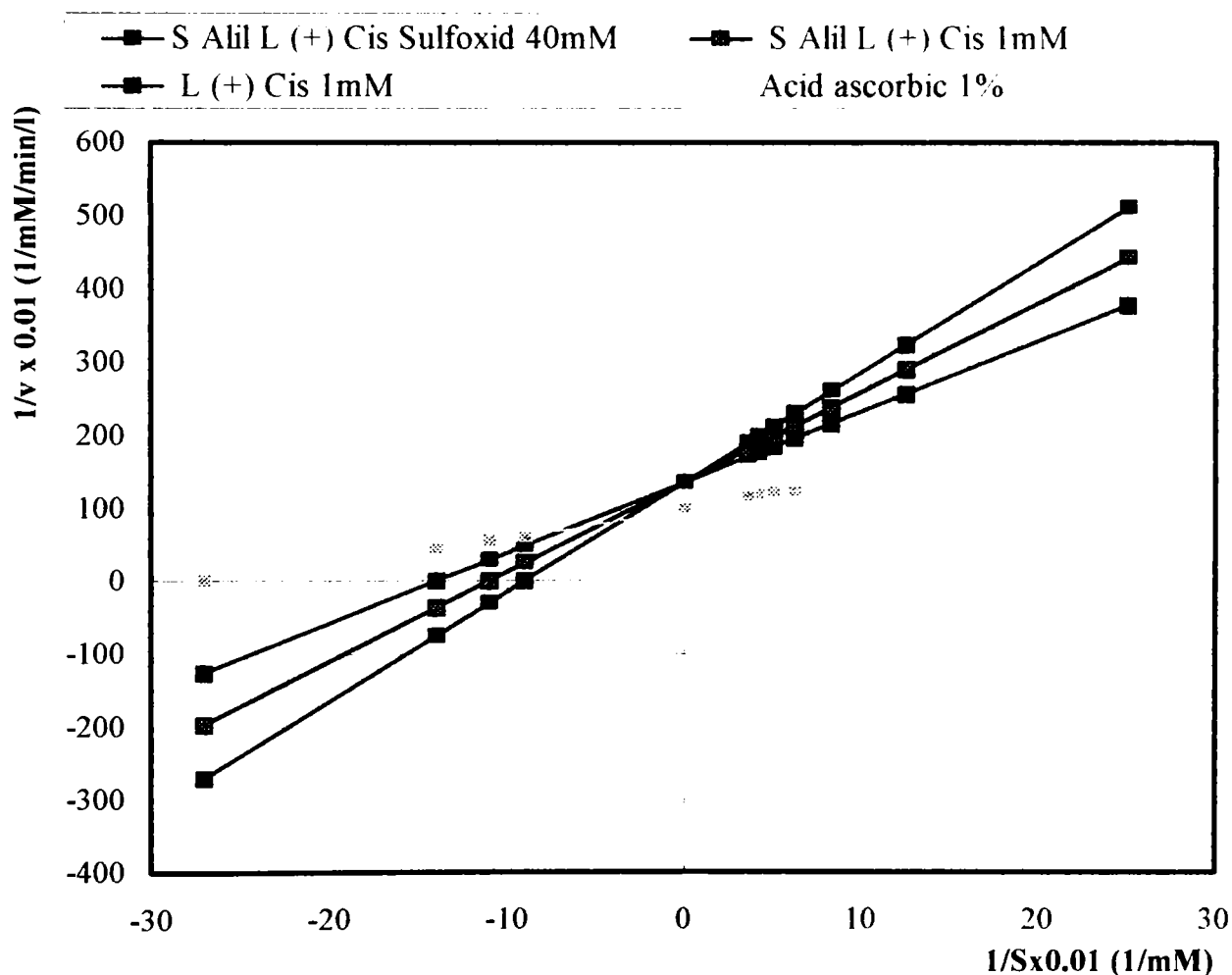
Determinarea constantei Michaelis a enzimei allinaza în funcție de valorile inverse a concentrațiilor S-alil-L-(+)-cistein sulfoxidului $1/[S]$ și a vitezelor de reacție $1/V$, în prezența efectorilor

Tabelul 5.3.14

1/[S] 1/mM x 0.01	1/ V x 0.01 (1/mM/min/l), în prezența			
	Substrat	Efectori		
	S-alil-L-(+) Cis Sulfoxid	S-alil-L-(+)-Cis (1mM)	L-(+)-Cis (1mM)	Acid ascorbic 1%
25	376	441.8	510	198
12.5	255.5	288.4	322.5	155
8.3	215	236.8	259.5	140
6.25	195.2	211.7	228.75	123
5	183.2	196.3	210	120
4.16	175.1	186.0	197.4	118
3.57	169.4	135	188.5	115

Graficul 5.3.5

Reprezentarea Lineweaver-Burk pentru S-Alil-L-(+)-Cis Sulfoxid



În urma studiului cinetic efectuat anterior asupra activității allinazei pe cele patru tipuri de substraturi, atât în absența cât și în prezența unor efectori, și din reprezentarea prin grafice după modelul Lineweaver-Burk, s-au constatat următoarele:

Valorile constantei Michaelis (K_m) prin reprezentarea Lineweaver-Burk se găsesc la valori apropiate de cele determinate prin metoda Michaelis-Menten, ceea ce este redat în tabelul 5.3.15.

Pentru obținerea reprezentărilor Lineweaver-Burk au fost calculați următorii parametri: $1/[S]$ (1/mM), cantitatea de acid piruvic format (mM) pentru fiecare concentrație a substratului fără efector și în prezența efectorului, cantitatea de substrat transformată (mM/l), viteza de reacție v (mM/min/l) și $1/v$, după cum au fost redați în tabelele 5.3.2-5.3.14.

Constantele K_m s-au determinat din reprezentările Lineweaver-Burk, prin prelungirea dreptelor corespunzătoare fiecărui substrat martor, cât și a celor obținute în prezența efectorilor, până la intersecția cu abscisele respective.

În tabelul 5.3.15 sunt redate comparativ valorile K_m ale allinazei obținute atât prin reprezentarea Michaelis-Menten cât și prin reprezentarea grafică Lineweaver-Burk (K_m) în absența efectorilor; deasemenea sunt redate valorile K_m , respectiv valorile constantei de inhibiție K_i , obținute din reprezentarea Lineweaver-Burk a acțiunii allinazei asupra celor patru substraturi în prezența efectorilor: S-alchil-L-(+)-cisteinei, L-(+)-cisteina și a acidului ascorbic.

Constanta de inhibiție K_i s-a calculat cu formula

$$K_i = \frac{I}{\frac{K_m}{K_m} - 1}$$

Unde K_m = constanta Michaelis obținută prin reprezentarea Michaelis-Menten

K_m = constanta Michaelis obținută prin reprezentarea Lineweaver-Burk

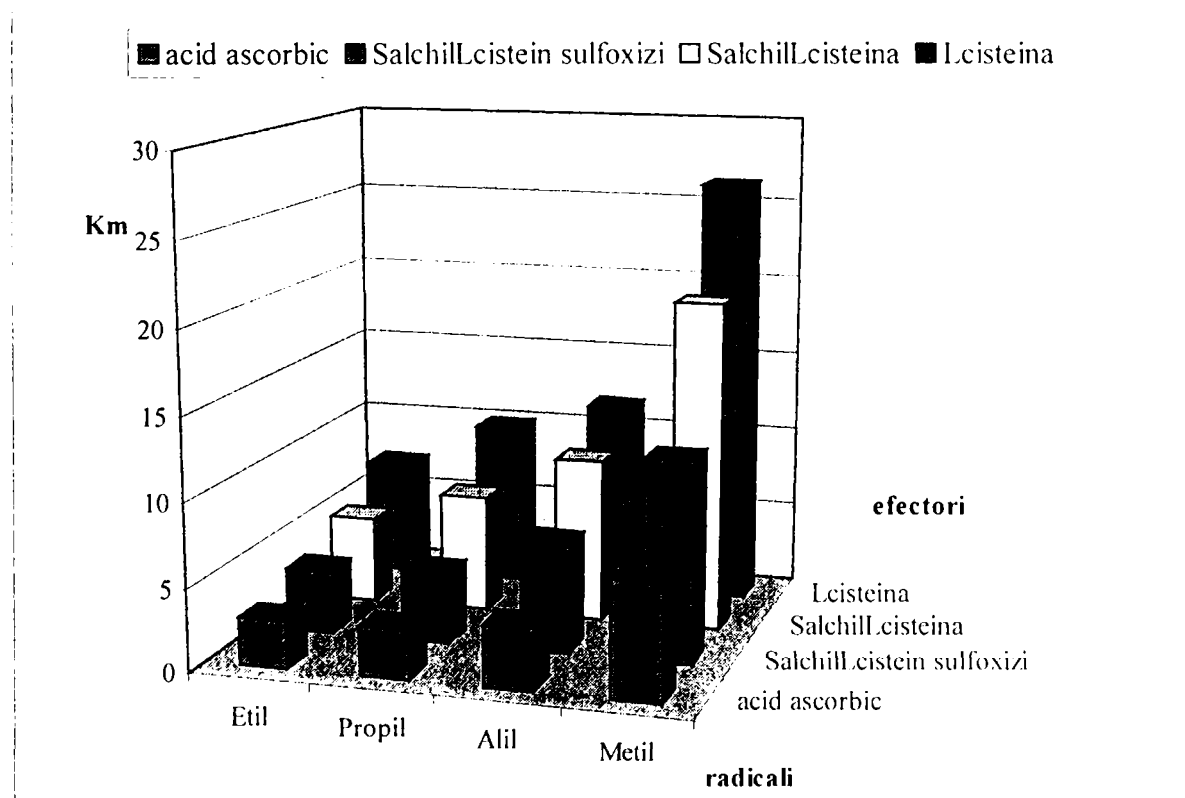
Valorile constantei Michaelis (K_m , K^m) ale allinazei față de S-alkil-L-(+)-cistein sulfoxizi în absența și în prezența unor efectori

Tabelul 5.3.15.

Nr. Crt.	Substrat	Km fără efector	S-alkil-L-(+)-cisteina corespunzătoare			L-(+)-cisteina			Acid ascorbic	
			K^m	%	Ki	K^m	%	Ki	K^m	%
1.	S-metil-L-(+) cistein sulfoxid	12.10	20	-39.5	1.53	26.3	-54.1	0.83	6.89	+43.1
2.	S-etil-L-(+) cistein sulfoxidul	3.84	5.26	-27	2.70	7.14	-46.3	1.16	2.85	+25.7
3.	S-propil-L-(+) cistein sulfoxidul	4.34	7.14	-39.3	1.55	10.0	-56.6	0.76	2.94	+32.3
4.	S-alil-L-(+) cistein sulfoxidul	6.66	9.90	-32.7	2.05	11.7	-43.4	1.30	3.70	+44.5

Graficul 5.3.6.

Dinamica activității allinazei în prezența efectorilor



Se poate observa atât din tabelul 5.3.15. cât și din graficul 5.3.6 că față de valorile lui K_m a allinazei care redau afinitatea pentru cei patru sulfoxizi, utilizați ca și substraturi, (rândul al 2-lea din grafic) , afinitatea enzimei pentru substrat se diminuează în prezența S-alchil-L-cisteinei, la toate cele patru substraturi cu valori ale K_m cu 27 și 39.5 % mai ridicate față de K_m inițial, dar într-o măsură mai mică față de inhibarea produsă de prezența S-(+)-cisteinei ; procentul de inhibare a activității enzimei se situează , în acest caz , la valori ale K_m cu 43.4 - 56.6 % mai mari .

În tabelul 5.3.15 sunt redate valorile comparative ale K_m atât față de K_m al allinazei fără efector cât și în prezența acestora, calculându-se și constanta de inhibiție K_i .

Cu cât valoarea constantei de inhibiție este mai mică cu atât inhibiția este mai înaintată. Astfel s-a constatat o afinitate mai mare a centrului catalitic al allinazei față de L-(+)-cisteina. Aceasta reduce activitatea enzimatică a allinazei față de S-alchil L-(+)-cisteinsulfoxizi în următoarea ordine: la S-propil-L-(+)-cistein sulfoxidul se înregistrează o constantă de inhibiție $K_i = 0.76$ ceea ce reprezintă o creștere a K_m de la 4.34 la 10, respectiv o diminuare a vitezei de reacție față de S-propil L-(+)-cistein sulfoxidul cu 56.6%; în cazul S-metil-L-(+)-cistein sulfoxidului se înregistrează o valoare $K_i=0.83$, ceea ce reprezintă o creștere a constantei Michaelis de la 12.10 la 26.3, adică cu 54.1%.

În cazul S-metil-L-(+)-cisteinei inhibiția se manifestă astfel: o creștere de 39.5% ($K_m=20$ față de $K_m=12.10$), respectiv se înregistrează o constantă de inhibiție $K_i=1.5$, valori foarte apropiate de cazul S-propil-L-(+)-cistein sulfoxidul. Se remarcă o afectare mai puțin intensă în cazul afinității față de S-alil L-(+)-cistein sulfoxidul și a S-etil-L-(+)-cistein sulfoxidul.

Aceasta demonstrează că inhibitorii , datorită structurii lor asemănătoare cu a substratelor, blochează parțial situsul catalitic al allinazei.

Tipul de inhibare pentru substratele luate în lucru s-a stabilit prin reprezentarea Lineweaver-Burk , iar rezultatele sugerează prezența unei inhibări competitive (alura graficului și punctul de întâlnire a tuturor dreptelor obținute pe grafic , redau faptul că viteza reacției enzimatică nu se modifică dar se modifică înclinarea pantei).

În contrast cu efectul inhibitor a S-alchil-L-(+)-cisteinelor și respectiv a L-(+)-cisteinei, acidul ascorbic mărește afinitatea alinazei pentru substrat, în toate cele patru cazuri cu 25.7-44.5%, astfel încât se observă o creștere a vitezei de reacție, respectiv o scădere a K_m de la 6.66 la 3.70 în cazul S-alil-L-(+)-cistein sulfoxidului (ceea ce reprezintă o creștere a afinității centrului catalitic cu 44.5%), iar în cazul S-metil-L-(+)-cistein sulfoxidului, K_m scade de la 12.10 la 6.89, înregistrându-se o creștere a afinității cu 43.1%.

Aceste observații sunt în concordanță și cu observațiile regăsite în literatura de specialitate.

Concluzii

- Valorile obținute arată ordinea afinității față de substrat. Cea mai mare afinitate se regăsește la sulfoxidul S-etil-L-(+)-cisteinei ($K_m=3.40$), urmat de sulfoxidul S-propil-L-(+)-cisteinei ($K_m=4.20$), sulfoxidul S-alil-L-(+)-cisteinei ($K_m=6.60$) și sulfoxidul S-metil-(+)-cisteinei ($K_m=12.0$);
- Tipul de inhibare pentru substratele luate în lucru s-a stabilit prin reprezentarea Lineweaver-Burk; se sugerează prezența unei inhibări competitive între S-alchil-L-(+)-cisteine , L-cisteină și substrat , înregistrându-se scăderi ale afinității enzimei față de sustrat cu 27-56.6 %) ;
- L-(+)-cisteina manifestă în cazul S-propil-L-(+)-cistein sulfoxidul o diminuare a vitezei de reacție cu 56.6%, se înregistrează o constantă de inhibiție $K_i = 0.76$; în cazul S-metil-L-(+)-cistein sulfoxidului se înregistrează o valoare $K_i=0.83$, ceea ce reprezintă o creștere a constantei Michaelis de la 12.10 la 26.3, adică cu 54.1%.
- În cazul S-metil-L-(+)-cisteinei inhibiția se manifestă astfel: o creștere de 39.5% ($K_m'=20$ față de $K_m=12.10$) în cazul S-metil-L-(+)-cistein sulfoxidul, respectiv se înregistrează o constantă de inhibiție $K_i=1.5$; valori similare se înregistrează și în cazul S-propil-L-(+)-cistein sulfoxidului. Se remarcă o afectare mai puțin intensă în cazul afinității față de S-alil-L-(+)-cistein sulfoxid și de S-etil-L-(+)-cistein sulfoxid;
- Efectul de inhibare competitivă se realizează mai pregnant în cazul L-(+)-cisteinei, ceea ce implică o competitivitate structurală față de situsul catalitic al alinazei;
- Acidul ascorbic acționează ca activator al enzimei , înregistrându-se creșteri ale afinității enzimei față de sulfoxidul S-alchil-L-(+)-cisteinei cu 25.7-44.5 %.

CAPITOLUL 6

TESTE BIOLOGICE ALE EXTRACTELOR DE ALLIUM SATIVUM ȘI ALE UNOR DERIVAȚI DE S-ALCHIL-L-CISTEINĂ

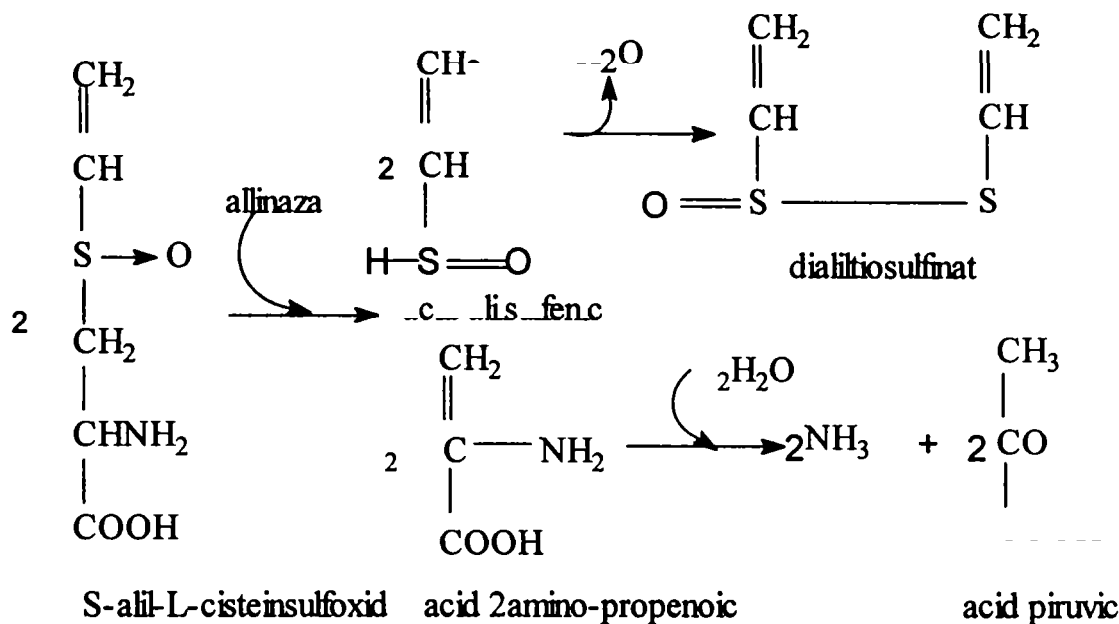
6.1. Determinarea activității bactericide și bacteriostatice ale unor extracte de *Allium sativum* și derivați de S-alkil-L-cisteină

Proprietățile antibacteriene ale speciei *Allium sativum* și *Allium cepa* au fost abordate științific pentru prima dată de către Louis Pasteur în 1858; au urmat ani de cercetări, care au indicat di(2-propenil)sulfura și respectiv di(2-propenil) tiosulfiantului (denumită ulterior allicină), drept compușii răspunzători de acțiunea bactericidă și bacteriostatică a acestor plante(49).

Aceste proprietăți au fost intens studiate în ultimul deceniu, *Allium Sativum* dovedindu-se a fi o plantă cu activitate antimicrobiană, antifungică, antibacteriană și insecticidă.

Aceste proprietăți au fost descrise mai pe larg în capitolul 2 al tezei. O serie de autori au explicat aceste proprietăți ca fiind o consecință a reacției acestor compuși cu sistemele biologice ce conțin grupări tiolice. Grupările tiolice sunt componente necesare dezvoltării microorganismelor, astfel că prin acțiunea alicinei, acești compuși sunt practic inactivați fiind transformați în compuși cu legături disulfurice.

Alicina se formează prin acțiunea enzimei allinaza asupra allinei(S-propenil-L-cisteina); ea nu a fost identificată în plantele intacte; enzima este activată numai în momentul distrugerii țesuturilor plantei; enzima este considerată a fi prezentă în compartimente diferite ale plantei, față de cele ce conțin aminoacidul S- substituit; în urma distrugerii țesuturilor plantei, barierele celulare sunt distruse iar alinaza conduce la transformarea allinei în acid alil sulfenic (care se transformă spontan în allicină), acid piruvic și amoniac, după reacția:



Scopul studiului efectuat a fost de a identifica prezența caracterului bactericid și bacteriostatic al speciei *Allium sativum* autohton, în diferite forme de extract, comparativ cu a unor produși comercializați, din import, cu S-alkil-L-cisteinsulfoxizi obținuți prin sinteză de laborator cât și cu efectul bactericid și bacteriostatic al unor antibiotice cunoscute.

Testarea acestor calități, în special a efectului bactericid și bacteriostatic a fost făcută similar testelor la care sunt supuse antibioticele asupra a diferiților germeni gram pozitivi și gram negativi.

6.1.1. Material și metodă

S-a studiat efectul bactericid și bacteriostatic al următoarelor tipuri de extracte :

1. extractul obținut prin distilare uscată în mediu de gaz inert CO₂ sau N₂, la temperatura de 80-120°C, p= 20-30 mm Hg ;
2. extractul apos proaspăt de *Allium Sativum* cu un conținut de 0.58gtiosulfinați/100g bulb proaspăt;
3. extractul apos proaspăt de *Allium Sativum* cu un conținut de 0.58gtiosulfinați/100g bulb proaspăt, cu adaos de glicerină 10%
4. același extract apos de *Allium Sativum* (menținut 24 ore la temperatura de 4°C) cu un conținut de 0.118g tiosulfinați/ 100g bulb proaspăt ;
5. S-etil-L-cisteinsulfoxid obținut în laborator (2g% în apă distilată)
6. S-propil-L-cisteinsulfoxid obținut în laborator(2g% în apă distilată)
7. S-alil-L-cisteinsulfoxid obținut în laborator(2g% în apă distilată)
8. Capsule "Garlic"- "Largo" U.S.A, în termen de valabilitate

9. Capsule "Knoblauch" – "Abtei Pharma" Germania, în termen de valabilitate acestea au fost testate pe antibiografe, executate pe un număr de nouă bacterii gram pozitive și gram negative, atât prin metoda diluțiilor seriate cât și prin metoda difuzimetrică .

Antibiograma prin metoda diluțiilor are avantajul unei evaluări cantitative exacte , permițând stabilirea dozei minime utile precum și definirea exactă a concentrației minime de inhibare (C.M.I.) sau a concentrației minime bactericide (C.M.B.)

Mediile de cultură utilizate au fost :

- *Bulionul de carne*: s-au cântărit 500 g de carne de vită curățată în prealabil de aponevroze, tendoane și grăsimi, și s-a mărunț ; peste aceasta s-au adăugat 1000 ml apă și s-a lăsat la macerat, la temperatura camerei timp de 24 de ore. Maceratul a fost supus fierberii timp de 30 de minute după care s-a filtrat prin vată. La filtrat s-au adăugat 10 g peptonă și 5g clorură de sodiu după care s-a încălzit la temperatura de 80 °C pentru dizolvarea acestora; s-a ajustat pH-ul la valoarea de pH= 7.6 cu ajutorul unei soluții de NaOH 10% , după care întregul amestec a fost din nou supus fierberii , la 100°C timp de 15 minute . Amestecul a fost apoi filtrat și introdus într-un balon prevăzut cu dopuri de vată ; acesta a fost apoi supus sterilizării prin autoclavare timp de 30 de minute la 115°C. Acest mediu de cultură a fost utilizat apoi pentru testare.

Agarul nutritiv (geloza) (Mueller-Hinton) (303). Acesta este un mediu solid care s-a preparat prin adăugarea la bulionul preparat anterior a fibrelor de agar (preparat din alge marine). Aceste fibre au proprietatea de a se dizolva în apă la temperatura de 80-90°C și de a se solidifica la 45°C.

Prepararea a fost efectuată astfel: S-au măsurat 500 ml de bulion, la care s-au adăugat 10 fibre de agar fin mărunțit și s-au încălzit la 90 °C. Amestecul fierbinte s-a filtrat prin vată ; o parte din acest amestec s-a repartizat în eprubete care au fost astupate cu dopuri de vată. Eprubetele au fost supuse sterilizării prin autoclavare timp de 30 de minute la 120 °C. Agarul, prin răcire , s-a solidificat în eprubetele menținute în poziție înclinată.

Culturile bacteriene utilizate au fost preparate în laboratoarele de Microbiologie a Facultății de Medicină Veterinară, Timișoara și au fost obținute prin izolarea germenilor în stare pură , în mediu lichid de cultură. Aceste culturi tinere de 24 de ore au fost utilizate ca atare .

Însămânțarea cu microorganisme s-a executat cu mare atenție, pentru a preveni contaminarea cu germeni nedorți, din aer sau de pe instrumentarul cu care s-a lucrat.

Determinarea concentrației minime inhibante (CMI)

În 18 eprubete în care s-au introdus câte 5 ml din mediul de cultură lichid (bulionul de carne) s-a efectuat însămânțarea cu ajutorul anselor bacteriologice. Fiecare ansă a fost în prealabil sterilizată la flacără, după care s-a efectuat prelevarea de material patologic (o picătură de material patologic în bucla ansei). Aceasta s-a introdus în eprubetă și s-a spălat în mediu. După însămânțare gura fiecărei eprubete s-a sterilizat prin flambare și s-a închis cu un dop de vată sterilizată. Ansa bacteriologică s-a sterilizat apoi prin înroșire în flacără, și s-a introdus apoi în vasul cu dezinfectant.

S-au testat patru germeni gram negativi: Salmonella, Pseudomonas aeruginosa, E.coli și Proteus și doi germeni gram pozitivi: Stafilococ, Streptococ.

S-au executat câte 3 eprubete pentru fiecare germen patogen.

Principiul metodei constă în punerea în contact a germenului de testat cu diluții descrescânde din agentul antimicrobian în condiții standard de lucru.

Metoda s-a realizat prin diluții seriate în bulion. Procedul s-a repetat pentru fiecare din cei 6 germeni patogeni testați.

Au fost efectuate diluții din cei 9 agenți antimicrobieni amintiți anterior și anume: pentru fiecare set au fost realizate următoarele diluții în bulion: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/200, 1/400 și 1/800 în eprubetele special pregătite pentru testare.

Au fost obținute în total 540 eprubete cu medii de cultură, însămânțate și cu agenți antimicrobieni (9 agenți antimicrobieni x 10 diluții x 6 germeni patogeni) și 6 eprubete cu bulion de carne însămânțate cu culturi pure de germeni, care au fost utilizate ca etalon de comparație a activității agenților antimicrobieni.

Fiecare eprubetă a conținut 1 parte agent antimicrobian (10 diluții), 9 părți de bulion de carne și s-a însămânțat fiecare diluție cu 1 picătură de cultură proaspătă, preluată cu o ansă calibrată.

Tuburile însămânțate s-au incubat în termostat la 37 °C, timp de 24 ore, după care s-a realizat citirea efectului bacteriostatic (concentrație minimă inhibantă = CMI) pe baza dezvoltării culturii.

Pentru **determinarea efectului bactericid (concentrație minimă bactericidă = CMB)** s-a utilizat metoda difuzimetrică; astfel s-au efectuat însămânțări pe geloză înclinată, în 5 tuburi (câte două față de tubul cu concentrație minimă inhibantă).

Însămânțarea s-a efectuat cu ajutorul ansei bacteriologice. Aceasta, încărcată cu material patologic, s-a spălat în agarul încă cald în cazul în care mediul s-a repartizat în eprubete.

Eprubetele s-au incubat în termostat la temperatura de 37°C, timp de 24 de ore.

S-au efectuat însămânțări în bulion pentru a se obține culturi tinere de 24 de ore.

Pregătirea mediului pentru antibiogramă s-a efectuat prin repartizarea mediului Mueller-Hinton topit, în strat gros de 4 mm în cutii Petri.

În paralel s-au decupat runde de hârtie de filtru Whatmann 2 care au fost impregnate cu o cantitate egală din cele 9 soluții de cercetat.

După ce mediul s-a solidificat au fost însămânțate, în cutii Petri diferite, prin inundarea suprafeței mediului, culturi bacteriene în vârstă de 24 ore.

După uscarea suprafeței mediului însămânțat, au fost depuse, cu o pensă fină, microcomprimatele cu substanțele de cercetat, respectându-se distanța de 30 mm între microcomprimate și 15 mm de la marginea plăcii Petri. Astfel s-au putut grupa pe placa Petri toate cele 9 microcomprimate.

Aprecierea efectului asupra speciilor bacteriene s-a făcut prin măsurarea razei zonei de inhibiție calculată de la marginea microcomprimatului până în zona în care se dezvoltă cultura.

Rezultatele obținute prin metoda difuzimetrică sunt prezentate în tabelul 6.1.2.

6.1.2. Rezultate și discuții

Aprecierea concentrația minimă de inhibare (CMI) a substanțelor testate prin metoda diluțiilor, s-a efectuat pe baza dezvoltării culturii în eprubetele însămânțate. Eficiența maximă a extractului a fost considerată în eprubeta cu diluția în care nu s-a dezvoltat cultura.

Rezultatele obținute prin metoda diluțiilor seriate sunt prezentate în tabelul 6.1.1, la diluții ale produșilor de reacție, asupra a șase bacterii gram pozitive și gram negative.

Acțiunea bactericidă a S-alchil-L-cisteinsulfoxizilor și a unor extracte de Allium sativum asupra germenilor gram pozitivi și gram negativi, determinată prin metoda diluțiilor

Tabelul 6.1.1.

Specia bacteriană	Concentrația minimă de inhibare CMI					Concentrația minimă bactericidă CMB				
	Tipuri extracte									
	Extr. dist.	Extr. apos	Extr. apos + glicer ină	S-etil- L-Cis Soxid	S-alil- L-Cis Soxid	Extr. dist.	Extr. apos	Extr. apos + glicer ină	S-etil- L-Cis Soxid	S-alil- L-Cis Soxid
	1	2	3	5	7	1	2	3	5	7
Salmonella	1/40	1/80	1/80	1/10	1/20	1/10	1/20	1/20	1/5	1/5
E. coli	1/20	1/40	1/60	1/10	1/20	1/10	1/20	1/40	1/5	1/5
Proteus	1/80	1/80	1/80	1/5	1/10	1/20	1/10	1/20	1/5	1/5
Pseudo monas	1/20	1/20	1/20	1/5	1/10	1/5	1/10	1/10	1/5	1/5
Stafilococ	1/40	1/40	1/40	1/10	1/10	1/20	1/20	1/40	1/5	1/5
Streptococ	1/40	1/40	1/40	1/10	1/10	1/20	1/40	1/40	1/5	1/5

Din tabel se observă că efectul cel mai bun îl prezintă extractul apos pur (2) cât și cel stabilizat cu glicerină (3), la o diluție de 1/80 (pentru Salmonella și Proteus) atât în ceea ce privește concentrația minimă de inhibare (CMI) cât și concentrația minimă bactericidă (CMB). Un efect similar îl prezintă și extractul obținut prin distilare uscată (1) (la diluții ceva mai mici: 1/40 pentru Salmonella și Proteus), comparativ cu efectul sulfoxizilor sintetizați de noi (5, 7); Aceștia au un efect mai slab asupra germenilor gram pozitivi și negativi, acționând numai la concentrații de 4 ori mai mari (2g%), spre deosebire de extractele de Allium sativum (0.58g tiosulfinați/ 100g bulb uscat). Acest fapt s-ar putea datora efectelor combinate cu a celorlalți compuși cu sulf existenți în extractul de Allium sativum, care ar putea avea efecte de potențare a activității bactericide a extractului.

Tipurile 4 (extract apos de *Allium sativum* menținut 24 de ore la temperatura de 4 °C) și respectiv 6 (S-propil-L-cisteinsulfoxidul) de extracte, precum și extractele 8 și 9 nu au prezentat un efect bacteriostatic care să poată fi determinat , în nici una dintre eprubete. microorganismele dezvoltându-se într-un mod aproape identic cu cele aflate în eprubetele etalon.

În ceea ce privește rezultatele obținute prin cea de-a doua metodă (metoda difuzimetrică), efectuată cu aceleași tipuri de extracte și produși pe bază de *Allium sativum* ca cele prezentate anterior (1-9) , acestea sunt prezentate în tabelul 6.1.2.

Interpretarea rezultatelor se face în felul următor : sensibil , când raza depășește 6 mm, puțin rezistent , când raza depășește 2-5 mm și rezistent , sub 1mm

**Acțiunea bactericidă , determinată prin metoda difuzimetrică a unor S-
alchil-L-cisteinsulfoxizi și a trei extracte de *Allium sativum***

Tabelul 6.1.2.

Specia bacteriană	Extr. dist.	Extr. apos	Extr. apos cu glic.	Extr. apos 4°C 24 h	S-etil-L-Cis Soxid	S-propil L-Cis Soxid	S-alil-L-Cis Soxid	Garlic SUA	Knoblauch Germ.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Salmonella	3	4	5	R	R	R	2	R	1
Bacillus cereus	4	6	8	R	R	R	R	R	R
E.coli	4	6	8	R	R	R	R	R	2
Stafilococ	4	5	8	R	R	R	2	R	1
Streptococ	3	6	8	R	R	R	R	1	2
Pseudomonas	3	R	R	R	R	R	R	2	2
Proteus	2	4	5	R	R	R	R	1	2
Mezentericus	2	5	6	R	R	R	R	R	2

R= rezistent; a = raza de inhibiție , în mm

Se observă că rezultatele sunt similare cu a celor obținute anterior, prin metoda diluțiilor seriate.

Rezultatele cele mai bune se înregistrează prin utilizarea extractului apos proaspăt stabilizat cu glicerină 10% , când se înregistrează raze de inhibiție de 8 mm pentru *Bacillus*

cereus, E.coli, Stafilococ și Streptococ; efecte bune are și extractul apos cu 0.58g tiosulfinați/100g bulb uscat, înregistrând zone de inhibiție de 6 mm la Bacillus cereus , E.coli și Streptococ, ceilalți germeni dovedindu-se puțin sensibili sau chiar rezistenți la substanțele cercetate.

Similar cu rezultatele obținute prin metoda diluțiilor, se constată o sensibilitate scăzută a germenilor patogeni studiați față de S-alchil-L-cisteinsulfoxizii sintetizați; se înregistrează zone de inhibiție de 2 mm doar la Salmonela și Stafilococ la tratamentul cu S-alil-L-cisteinsulfoxid.

Raze de inhibiție extrem de reduse se înregistrează și la produșii comercializați, față de extractele proaspete de Allium sativum.

Prin testele efectuate anterior , se atestă efectul bactericid superior al extractelor de Allium sativum autohton, față de compușii sintetizați și presupuși ca având efect bactericid.

6.1.3.Concluzii:

- Concentrația minimă inhibantă (CMI) și concentrația minimă bactericidă (CMB) se înregistrează la **extractul apos stabilizat cu glicerină 10%** , la diluții de 1/80 în bulion , față de Salmonella, Proteus și Streptococ și la diluții de 1/40 față de E.coli și Stafilococ
- Extractul apos de Allium sativum cu o concentrație de 0.58g % tiosulfinați are un efect similar cu cel al extractului obținut prin distilare uscată, în mediu de gaz inert, la 80-120°C și un vid de 25 mmcol.Hg
- Efectul S-alchil-L-cisteinsulfoxizilor obținuți sintetic este mai slab comparativ cu al extractelor naturale
- Efectele superioare ale extractelor față de cele ale S-alchil-L-cisteinsulfoxizilor sintetizați s-ar putea datora efectelor combinate cu a celorlalți compuși cu sulf existenți în extractul de Allium sativum, care ar putea avea efecte de potențare a activității bactericide a extractului.
- Produșii naturali ar putea acționa prin intermediul tiosulfinaților și a altor compuși cu sulf la nivelul grupărilor SH reactive din membranele celulare ale unor microorganisme

6.2. Determinarea activității antifungice a extractului apos de *Allium sativum*

În urma studiilor efectuate din literatura de specialitate s-a desprins faptul că specia *Allium* se distinge , pe lângă efectul bactericid și bacteriostatic și printr-un efect antimicotic.

Ținându-se cont de faptul că extractul apos obținut din *Allium sativum* autohton a prezentat un efect bactericid și bacteriostatic evident, unul din scopurile studiului nostru a fost și acela de a pune în evidență efectul antimicotic al acestuia datorită faptului că astăzi, sub acțiunea factorilor favorizanți , din ce în ce mai numeroși și mai agresivi asupra organismului animal-numărul fungilor patogeni a crescut extrem de mult, unii dintre ei constituind așa numiții " contaminanți" , dovediți în prezent ca agenți al unor afecțiuni foarte grave.

Fungiile prezintă o extrem de mare diversitate și, în anumite condiții, devin patogene, fiind generatoare de diverse boli cu simptomatologii extrem de diferite și mod de tratament dificil.

Există o mare diversitate de medicamente antifungice de sinteză care acționează împotriva proliferării și pentru eliminarea lor totală din organism, dar majoritatea cu numeroase reacții secundare asupra organismelor animale.

În literatura de specialitate studiată am întâlnit o serie de efecte benefice ale speciei *Allium sativum* asupra unei destul de numeroase varietăți de fungii. Aceste efecte s-au întâlnit asupra tulpinilor de *Aspergillus*, *Cryptococcus*, diferite tipuri de *Candida* (328, 113, 26), *Candida albicans* aviară (245), *Candida tropicalis* (119), *Torulopsis*, *Trichosporum*(197), etc.

În ideea de a identifica prezența unui efect antimicotic și a extractului de *Allium sativum* autohton, am urmărit efectul extractului apos, la diferite diluții , asupra următoarelor fungii din genurile: *Penicillium*, *Cladosporium* și *Aspergillus flavus*.

6.2.1. Material și metodă

Pentru determinarea efectului antifungic s-a utilizat metoda diluțiilor înseriate.

Pentru aceasta, s-au cultivat culturi pure de fungii din genurile *Penicillium*, *Cladosporium* și *Aspergillus flavus* , pe mediu Sabouraud. Culturile stoc au fost dezvoltate la 37 °C timp de cinci zile pe mediu Sabouraud.

Însămânțarea mediilor de cultură în cazul funghiilor s-a efectuat respectând reguli extrem de stricte de sterilizare (s-a lucrat cu sticlărie și instrumentar steril), datorită faptului că aceste culturi pot fi ușor infestate cu spori ai altor funghi.

S-a prelevat câte 1g din fiecare din coloniile izolate din funghiile amintite anterior și s-au introdus individual în câte un balon Erlenmayer, apoi , aceste culturi s-au pus în contact cu ser fiziologic și s-au lăsat în repaus 24 de ore pentru flotarea sporilor de funghi, pentru asigurarea unei suspensii de celule viabile.

Direct din fiecare din cele trei flacoane, cu ajutorul unei anse sterile, s-au efectuat însămânțări pe mediu de cultură Sabouraud aflat în 45 cutii Petri, 15 pentru fiecare cultură (3 cutii Petri x 5 diluții ale extractului: E, E1-4)

Aceleași însămânțări s-au efectuat în cele 45 cutii Petri; în acestea s-au introdus cu câte 1 ml extract pur (cu un conținut de 0.98 mg tiosulfinați/ml extract) (E) (3 cutii Petri pentru fiecare tip de cultură = 9) și respectiv cu 1ml din diluțiile de 10^{-2} (E1) (9 cutii Petri), 10^{-3} (E2) (9 cutii Petri), 10^{-4} (E3) (9 cutii Petri) și 10^{-5} (E4) extract (9 cutii Petri). (diluțiile s-au realizat în ser fiziologic).

Cutiile Petri cu materialul de experiență au fost menținute timp de 24 de ore în termostat la 37 °C.

Rezultatele obținute în urma testării extractului de *Allium sativum* sunt prezentate în tabelul 6.2.1 și figura 6.2.1.

Interpretarea rezultatelor a fost efectuată vizual , comparativ cu plăcile Petri cu culturi pure și netratate cu extracte , ceea ce se poate observa și din figurile 6.2.1-6.2.3.

Efectul in vitro a extractului de *Allium sativum* asupra culturilor de *Penicillium*, *Cladosporium* și *Aspergillus*

Tabelul 6.2.1.

Tulpina	Diluții				
	Pur	E1	E2	E3	E4
Penicillium	+++	++	+	-	-
Cladosporium	+++	++	+	-	-
Aspergillus	+++	++	-	-	-

+++ efect 100 %; ++ efect 50 %; + efect 15 %

Concluzii:

- Extractul pur are un efect antimicotic de 100 % asupra tulpinilor de *Penicillium*, *Cladosporium* și *Aspergillus*;
- Un efect mai moderat o prezintă diluțiile crescânde ale extractului , pentru ca la diluții mai mari de 10^{-3} , efectul să dispară total.

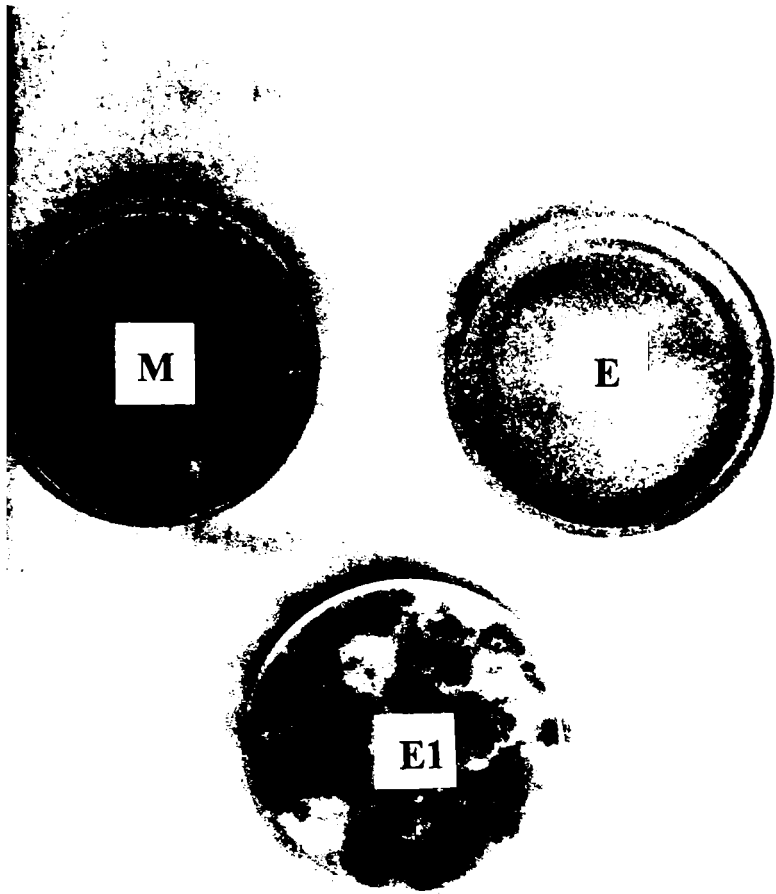


Figura 6.2.1 **PENICILLIUM**

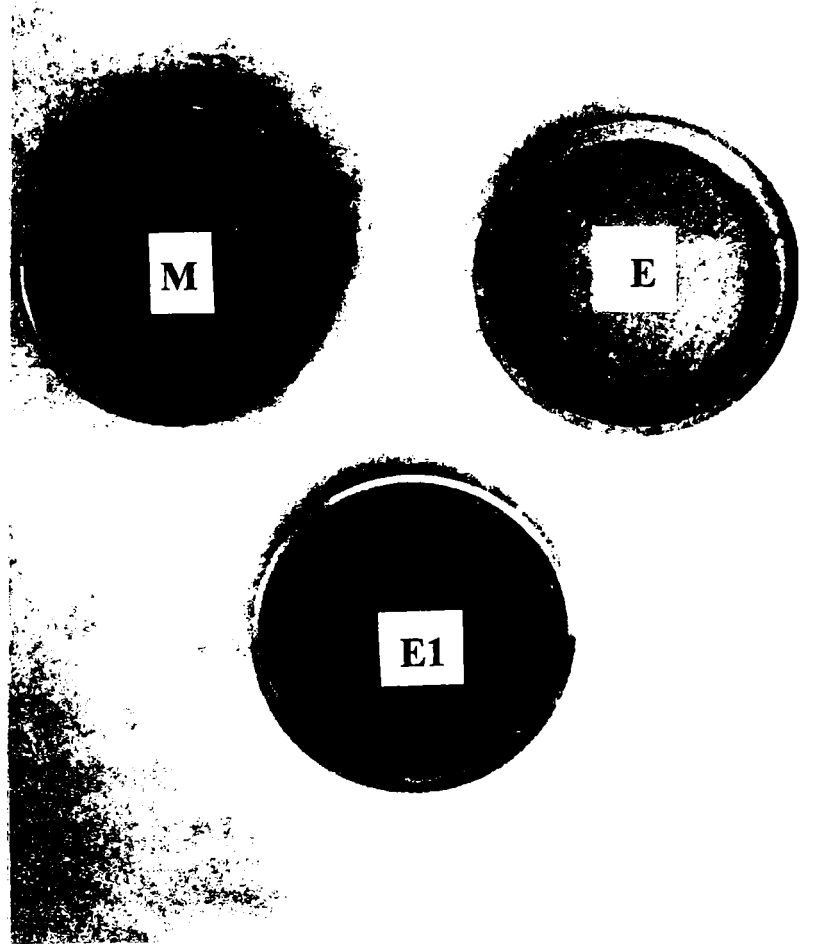


Figura 6.2.2 **CLADOSPORIUM**

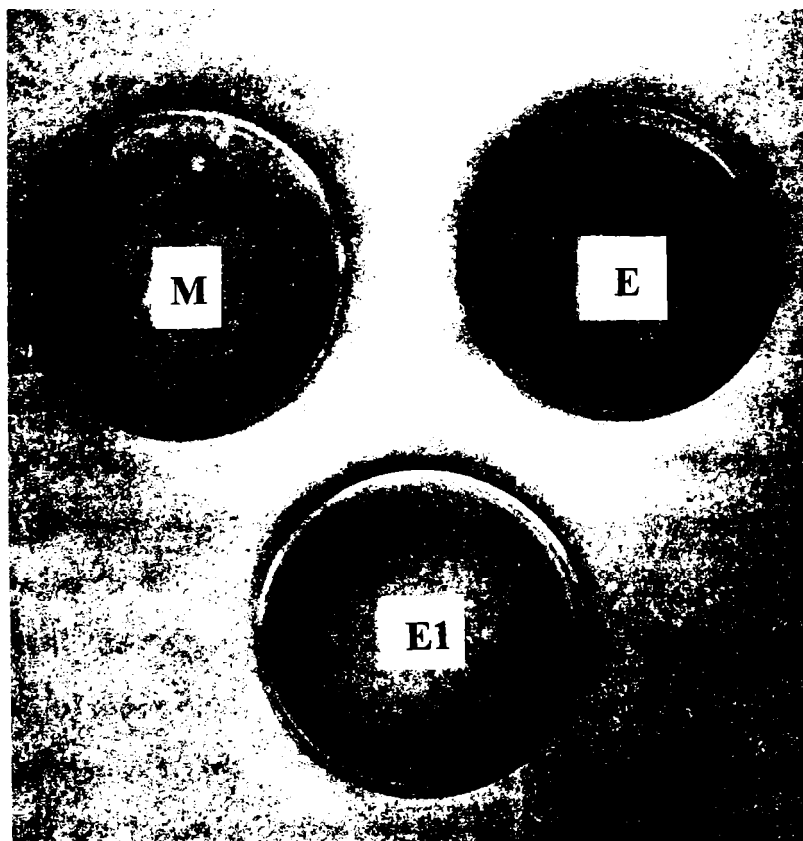


Figura 6.2.3 **ASPERGILLUS**

6.3. Decontaminarea aerului din incinte , prin operația de aerosolizare cu un extract de *Allium sativum*

6.3.1. Considerații teoretice

Datorită faptului că s-a dovedit efectul bactericid și bacteriostatic al extractului de *Allium sativum* , și ținând cont și de datele din literatură referitoare la această proprietate a *Allium sativum* (50) s-a încercat efectuarea unor experimente de decontaminare a aerului.

Decontaminarea constituie cea mai importantă măsură de prevenire și de combatere a bolilor transmisibile, ale omului și animalelor.

Decontaminarea sistematică a mediului de viață al organismelor animale este necesară nu numai pentru prevenirea apariției și combaterea bolilor infecțioase și parazitare majore, de mare difuzibilitate, ci și pentru stăvilirea tendinței de creștere continuă a gradului de contaminare a suprafețelor și a aerului cu diverși germeni nepatogeni și potențial patogeni, pe măsură ce crește densitatea animalelor și durata ciclului de exploatare a adăposturilor(75). În boxele pentru animale s-au găsit, pe diferitele suprafețe, în medie, 2.96 miliarde de unități formatoare de germeni (UFC) pe 1 cm³, din care 82 de milioane erau bacterii coliforme , iar 44 de milioane de celule au aparținut tipurilor enteropatogene de *E.coli* . Prin sistemul de ventilație aerul poluat cu diferite microorganisme este evacuat în exteriorul adăposturilor, iar de aici poate fi recirculat în adăposturile învecinate sau dus de vânt până la distanțe foarte mari.

Decontaminarea profilactică a incintelor în perioada repausului sanitar în sistemul de creștere intensivă a animalelor, este extrem de importantă și absolut necesară.

Efortul continuu al organismelor de neutralizare a germenilor , ce aderă în număr exagerat de mare pe mucoase, duce treptat la epuizarea factorilor umorali și celulari de apărare, micșorând rezistența generală a organismului, astfel că în asemenea cazuri se înregistrează o stare de stres ce se manifestă prin hipertrofia și hipersecreția glandelor suprarenale, involuția bursei lui Fabricius, etc.

Prelungirea stării de stres favorizează diseminarea bacteriilor din focarele infecțioase primare în tot organismul.

Pentru prevenirea acestor stări de stres tot mai mulți specialiști scot în evidență necesitatea continuării periodice a acțiunilor de decontaminare , pentru menținerea

încărcăturii microbiene de pe suprafețe și din aer la un nivel cât mai coborât. Decontaminarea de întreținere se poate realiza prin mai multe tehnici, ca: ionizarea aerului, aerosolizarea și chiar stropirea suprafețelor cu anumite substanțe netoxice pentru organismele animale .

Dintre substanțele dezinfectante ce se utilizează în prezent putem enumera următoarele: clorul și substanțele clorigene(var cloros 25-30%, hipocloritul de sodiu 12.5 % clor activ, Cloramina B 25-30% clor activ, Cloramina T 2% p-toluensulfoncloramida , Clorom 70% diclorizocianurat de sodiu , Halazona –acid p-dicloramidofenol 4 mg/1dm³), iodul și iodoforii (Septosolul 5%, Septorom 5%), acizii și derivații lor (acidul clorhidric 1%, acidul lactic 40%, acidul boric 3%, beta-propiolactona 30 %, acidul peracetic 2%), bazele , săruri ale metalelor grele (în general Hg), agenți oxidanți, alcooli, fenoli, aldehide, agenți tensioactivi, decontaminanți complecși ai adăposturilor –sol, aer (75).

Scopul testărilor efectuate a fost de a dovedi eficiența utilizării pentru decontaminarea aerului de agenți patogeni a extractului natural de *Allium sativum* , care răspunde la majoritatea cerințelor unui bun decontaminant și în plus este netoxic.

6.3.2. Material și metodă:

Testul decontaminării aerului cu ajutorul unui extract de *Allium sativum* s-a efectuat pe culturi proaspete de *Escherichia coli* prin metoda sedimentării gravitaționale (304), comparativ cu alți doi decontaminanți: Septosol și Elorisan (nu conține antibiotice, chimioterapice și dezinfectanți chimici) (tabelul 6.3.1).

Metoda sedimentării gravitaționale constă în expunerea mediilor de cultură solide, repartizate în plăci Petri, în locurile unde urmează să se efectueze determinarea, pentru un timp diferit , de 1-15 minute. În intervalul de expunere are loc sedimentarea germenilor atașați de particulele cu greutate mai mare.

Controlul eficienței decontaminării s-a efectuat cu ajutorul metodei oficializată la noi în țară , metodă care se bazează pe determinarea prezenței coloniilor de *Escherichia coli* . Decontaminarea aerului se consideră eficientă , dacă pe mediul Levine, după incubare la 37°C timp de 24 ore, nu se dezvoltă colonii de *E.coli*; prezența acestora se manifestă prin apariția unei colorații violet închis cu luciu metalic

Încărcătura microbiană a aerului se poate exprima prin numărul de colonii (UFC) ce rezultă pe 1 cm² de mediu de cultură, după un anumit timp de expunere (75) și se poate calcula cu ajutorul formulei:

$$N = \frac{63662 \times n}{d^2 \times t}$$

unde:

N = numărul de germeni / m³ aer;

n= numărul de colonii pe întreaga placă Petri, stabilit prin numărarea tuturor coloniilor sau prin înmulțirea numărului de colonii de pe 1 cm², cu suprafața plăcii (cm²);

63662 = coeficient empiric,(coeficient Omeleanski) , derivat din faptul că pe o suprafață de 100cm², sedimentează un număr de microorganisme echivalent cu cel existent în 10 litri de aer;

d = diametrul plăcii în cm

t = timpul de expunere în minute

Caracteristicile substanțelor etalon decontaminante

Tabelul 6.3.1

Nr.crt.	Denumirea comercială	Firma producătoare	Acțiune	Compoziție	Conc. recomandată
1.	Septosol	Biofarm București	antiseptic dezinfectant spectru larg	iod complexat cu nonilfenol polietoxilat	sol.2-3% / m ³ aer
2.	Elorisan	ELORISAN GmbH Biostimulatore Germania	dezinfectant	extract natural de hrean, isop, uleiuri esențial bacteriostatice	sol.5 %/ m ³ aer

Au fost executate 6 experimente iar fiecare din acestea a fost executat într-un paralelipiped din plastic cu un volum de aer de V= 90 dm³, după ce în prealabil s-a verificat lipsa încărcăturii microbiene prin efectuarea controlului eficienței decontaminării ; pentru aceasta, cu ajutorul unui pulverizator s-au pulverizat 10 cm³ de cultură de 24 ore de Escherichia coli.

După pulverizarea culturii de E.coli s-a așteptat 5 minute pentru sedimentarea particulelor grosiere apoi s-a introdus în interiorul paralelipipedului o placă Petri cu mediu Levine . Placa a fost menținută 2 minute în incintă, după care s-a scos și s-a introdus într-un termostat la 37°C , timp de 24 ore; aceasta a constituit proba martor.

Cu același dispozitiv s-a pulverizat o cantitate de 100 cm³ de soluție de extract de Allium sativum de concentrații diferite. S-a așteptat din nou 5 minute, pentru sedimentarea aerosolilor grosieri, apoi s-a introdus o altă placă cu mediu Levine care s-a menținut 2 minute. La expirarea timpului s-a pus placa Petri la termostat la 37 °C.

Mediul Levine s-a preparat din mediul de bază G.E.A.M. care este format din: peptonă-1%, K₂HPO₄ 0.2%, agar- 1,5-2% și apă distilată până la 100ml, la care s-a adăugat: lactoză –2g/100 ml mediu, albastru de metil 0.5%- 1.3ml/100ml mediu, eozină 2 % - 2ml/ 100ml mediu.

Concentrația medie în principii activi cu proprietăți bactericide și bacteriostatice ale Allium sativum este de 1.84 μmoli/ml extract tiosulfinați (determinați prin metoda cu 2,4-dinitro fenilhidrazină)(178) respectiv de 1.10 μmoli/ml extract alicină (determinată prin metoda Nakata)(210).

6.3.3.Rezultate și discuții:

Rezultatele obținute în urma testărilor efectuate cu extract de Allium sativum în concentrații : de 10%, 5%, 2.5% și 1 % în apă distilată, comparativ cu Septosol și Elorisan sunt prezentate în tabelul 6.3.2.

Efectul extractului de Allium sativum , sub formă de aerosoli, asupra unei culturi proaspete de E.coli

Tabelul 6.3.2.

Nr.crt.	10%		5%		2.5%		1%	
	Nr. probe +/-	Probe pozitive %	Nr. probe +/-	Probe pozitive %	Nr. probe +/-	Probe pozitive %	Nr. probe +/-	Probe pozitive %
Allium s.	0/30	0	0/30	0	12/18	40	30/0	100
Septosol	0/30	0	0/30	0	10/20	33.3	25/05	83.3
Elorisan	0/30	0	15/15	50	20/10	66.6	30/0	100

Comparând efectul decontaminant al extractului de *Allium sativum* cu al Septosolului , rezultatele sunt compatibile deoarece raportat la încărcătura microbiană din incintă și cea din adăpost, rezultatele sunt proporționale. Încărcătura în U.F.C.(unități formatoare de colonii/ cm³ cultură) a fost de 1-2 miliarde unități , față de U.F.C./ cm³ adăpost unde valorile se situează la 200-300 unități/cm³ aer.

Dacă se compară efectul extractului pur cu cel al Elorisanului (extract natural), s-a constatat că extractul de *Allium sativum* are un efect decontaminat mai bun la aceeași cantitate și concentrație administrată.

Efectul decontaminării cu extract de *Allium sativum* (**E**)față de decontaminarea cu Elorisan (**E1**) , la aceeași concentrație , este prezentat în figura 6.3.1

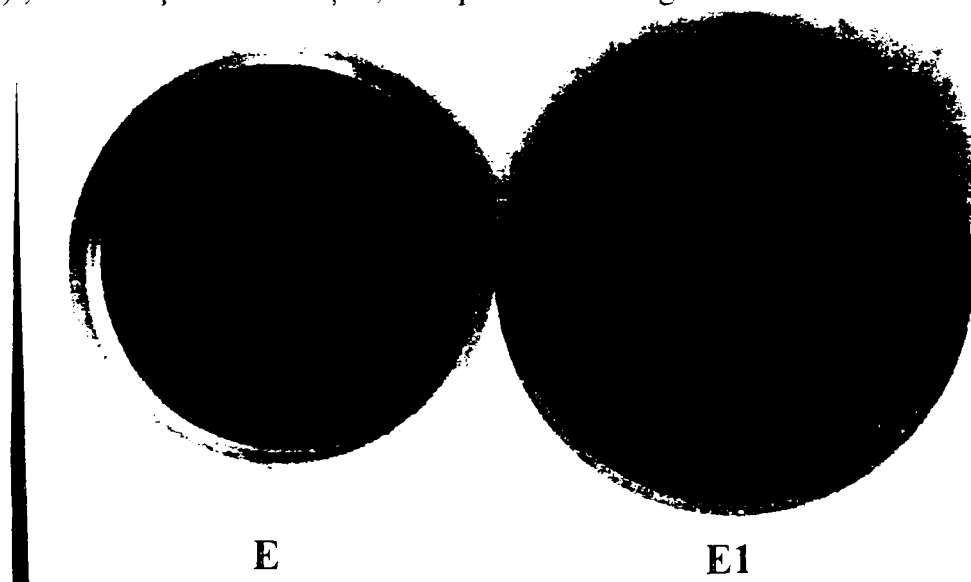


Figura 6.3.1.

Concluzii:

- Extractul de *Allium sativum* se poate utiliza la decontaminarea aerului în incinte infestate cu *Escherichia coli* ,în concentrații de 2.5-5%, cu efecte mai bune decât a produsului german Elorisan și comparabile produsului uzual Septosol.
- Rezultatele bune obținute de extractul de *Allium sativum* în decontaminarea aerului contaminat cu *Escherichia coli* s-ar putea datora acțiunii combinate atât a alicinei, tiosulfinaților cât și al altor compuși conținuți în extract a căror acțiune se potentează reciproc, așa cum s-a prezentat și în capitolul anterior 6.1.
- O explicație al efectului decontaminant ar putea fi dat de acțiunea compușilor activi ai *Allium sativum* la nivelul membranelor bacteriilor .

- Un avantaj major al decontaminării aerului cu extract de *Allium sativum* este și faptul că , fiind de natură vegetală, nu prezintă probleme în generarea de reziduri nedorite .

6.4. DETERMINAREA EFECTELOR UNOR EXTRACTE DE ALLIUM SATIVUM ASUPRA UNOR PARAMETRI BIOCIMICI ȘI ASUPRA ACTIVITĂȚII UNOR ENZIME LA ȘOBOLANI

În capitolul 1 a fost subliniată importanța rolului sistemelor oxido reducătoare în organismele animale. Fenomenele oxidative în care oxigenul este utilizat în metabolismul eritrocitar sunt următoarele: autooxidarea flavoproteinelor , a glutatationului, prin intermediul methemoglobinreductazei și a glutatation reductazei, precum și oxidarea prin flavoproteine a NADH produs prin glicoliza aerobă. Într-o mică măsură se petrece și oxidarea hemoglobinei în methemoglobină. Reducerea methemoglobinei la hemoglobină este stimulată de methemoglobinreductaza, enzimă dependentă de NADH și NADPH, de acid ascorbic și de glutatation (310)

Insuficiența mecanismelor reducătoare (catalaza, glutatation peroxidaza, glutatation reductaza) duce la acumularea de methemoglobină în eritrocite în cantități patologice, rezultând methemoglobinemie manifestă.

În cazurile în care hemoglobina este instabilă , se poate forma methemoglobină, care se leagă de alte hemoglobine denaturate, de glutatation sau de alte substanțe din eritrocit având ca rezultat niște agregate denumite corpi Heinz care migrează pe suprafața internă a membranei, legându-se de aceasta prin legături disulfidice.

Corpii Heinz apar în cazuri de hemoglobinopatii și în enzimopatii (310).

Declanșarea unor methemoglobinemii severe s-ar putea datora apariției unui metabolit intermediar având gruparea nitrozo aromatic ceea ce ar presupune existența unui deficit în șuntul pentozo-fosfatic din ficat sau în sistemele de detoxifiere hepatice. Prin reacțiile de oxidoreducere a unor medicamente rezultă H_2O_2 ce ar putea oxida hemoglobina sau pot induce hemoliza, dacă nu s-ar opune sisteme protectoare din hematie formate din glutatation- glutatation peroxidaza, catalaza și superoxid dismutaza, care acționează prompt în momentul producerii peroxidului de hidrogen(255).

Activitatea peroxidazică a catalazei se pare că este utilizată în reacțiile biochimice ca: metabolizarea alcoolului etilic , activitate antimicrobiană asociată fagocitozei, metabolizarea vitaminei K₃. Se presupune deasemenea că în ficat catalaza acționează peroxidazic (312).

Glutation peroxidaza descompune H₂O₂ mult mai eficient, decât catalaza (310).

Olinescu (231) susține că în hematie ar predomina acțiunea catalazică, potențată de glutation peroxidază (GSH-Px). În ficat , se va produce o competiție pentru peroxid între cele două enzime. Concentrația glutation reductazei din celule va orienta activitatea enzimei cu atât mai mult cu cât glutation reductaza poate inactiva catalaza .

Catalaza și glutation peroxidaza își manifestă un rol deosebit de important în protejarea membranei celulare de oxidarea distructivă determinată de H₂O₂ (261). În caz de insuficiență a activității glutation peroxidazei, se constată o creștere a activității catalazei.

Unele medicamente sau toxice administrate în cantitate mare, determină o creștere a activității glutation peroxidazei, solicitând capacitatea de protecție a celulei față de toxicitatea oxigenului(231).

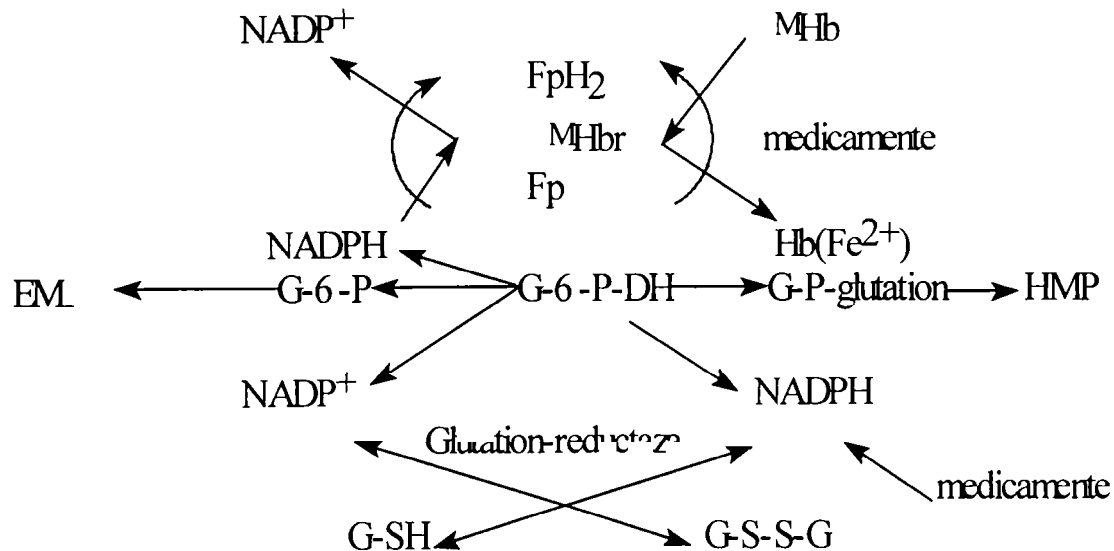


Figura 6.4.1 Rolul methemoglobin reductazei (MHbr) în transformarea methemoglobinei (MHb) și blocarea reacțiilor enzimatic prin medicamente methemoglobinizante; Fp- flavoproteine, G-SH-glutation redus, GSSG-glutation oxidat, EMP- glicoliza pe calea Embden-Meyerhoff-Parnas, HMP- șuntul hexozomonofosfaților; G-6-P-glucozo-6-fosfat, G-6-PDH-glucozo-6-fosfatdehidrogenaza (312)

Allium sativum s-a dovedit a fi o plantă cu efect antioxidant extrem de eficace. Totuși până în prezent în literatura studiată nu au fost întâlnite referiri complete la efectul posibil al diferitelor tipuri de extracte de Allium sativum asupra parametrilor sanguini ai organismelor animale ; pentru a putea corela valorile acestor parametri cu dozele de extract în vederea atingerii unor efecte benefice asupra acestor organisme, au fost efectuate diferite studii cu scopul de a identifica, în funcție de doza administrată :

- modificările ce apar la nivelul **principalilor parametri sanguini**
- modificările ce apar la nivelul **activității unor enzime plasmatică și eritrocitare**
- modificările ce apar la nivelul **unor organe**, precum și
- modificările ce apar la nivelul **formulei leucocitare**

la șobolani tratați atât cu extracte apoase concentrate cât și cu extracte apoase diluate de Allium sativum

Fiind bine cunoscute efectele bactericide și bacteriostatice cât și influența pozitivă asupra sistemului cardiovascular , în urma administrării unor extracte de Allium sativum, în lucrarea de față ne-am propus urmărirea influenței unui extract concentrat de Allium Sativum autohton asupra formulei leucocitare, a unor parametri biochimici și asupra unor organe (ficat, splină, rinichi) la șobolanii de laborator.

Au fost urmăriți următorii parametri biochimici: hemoglobinemia, methemoglobinemia, sideremia și proteinemia .

S-au determinat activitățile următoarelor enzime oxidoreducătoare : catalaza (E.C.1.11.1.6.), methemoglobin reductaza (E.C.1.4.1.6) și glutathion reductaza(E.C.1.6.4.2.) precum și activitatea transaminazelor alaninamino transferaza –ALAT (E.C.2.6.1.2.) și aspartatamino transferaza-ASAT (E.C.2.6.1.1.) .

6.4.1. Influența unui extract concentrat asupra unor enzime oxidoreducătoare (catalaza, methemoglobin reductaza, glutathion reductaza) și a unor parametrii biochimici în strânsă corelație cu oxidoreductazele.

6.4.1.1. Material și metodă:

Experimentul a fost efectuat asupra a 150 de șobolani de linie Hooder și Wistar, împărțiți în trei loturi de șobolani, a câte 50 de indivizi fiecare. Loturile au fost omogene în ceea ce privește greutatea, vârsta și sexul animalelor.

Șobolanii au fost menținuți tot timpul experimentului în condiții corespunzătoare atât din punct de vedere al microclimatului cât și al calității furajelor.

Administrările au fost efectuate, la cele trei loturi, zilnic, timp de șapte zile, după cum urmează:

- Lotului 1 i s-au administrat i.m. 0,2 ml extract concentrat de *Allium sativum* (0.72g tiosulfinați/ 100g material crud corespunzător unei doze de 10mg tiosulfinați /kgcorp /zi) (AS);
- Lotului al 2-lea i s-a administrat per os 0,5 ml soluție 1% de acid ascorbic corespunzător unei doze de 20 mg acid ascorbic/kg corp /zi (AA),
- Lotului al 3-lea i s-a administrat per os 0,5 ml apă distilată (lot martor-M).

Din fiecare lot s-au efectuat sacrificări a câte 5 indivizi, zilnic, până în ziua a șaptea a experimentului. După sistarea administrării, sacrificările au continuat după același sistem în ziua a 9-a respectiv a 12-a zi a experimentului ; au fost efectuate pe perioada experimentului 9 recoltări de sânge și organe.

Înainte de fiecare sacrificare s-a recoltat prin puncție cardiacă, sânge pe anticoagulant Heparină (5000 UI). După sacrificare s-au recoltat de la fiecare individ, următoarele organe: ficat, rinichi și splină.

Au fost determinate următoarele enzime:

- din eritrocit : enzimele oxidoreducătoare

- catalaza eritrocitară prin metoda colorimetrică Sinha , ✕
- methemoglobin reductaza și
- glutation reductaza prin metode spectrometrice, ✕

- din plasmă : transaminazele- alanin amino transferaza (ALAT) și aspartat amino transferaza (ASAT) prin metode spectrometrice ✕

precum și următorii parametri biochimici:

- hemoglobina, prin metoda Drabkin, ✕
- methemoglobina prin metoda cu cianmethemoglobină
- sideremia prin metoda Heilmeyer și
- proteinele totale - prin metoda Gornal

Dozarea activității catalazei sanguine

Catalaza sanguină s-a determinat prin metoda colormetrică Sinha (279). Această metodă se bazează pe faptul că dicromatul de potasiu este redus în mediu acid , de către peroxidul de hidrogen, la acetat cromic, compus colorat în verde care se poate fotocolorimetra la 570nm.

Astfel, catalaza sanguină se lasă să acționeze asupra unei cantități fixe de H_2O_2 , o perioadă determinată de timp, apoi reacția enzimatică este oprită prin adăugarea unui amestec de $K_2Cr_2O_7$ în soluție de acid acetic glacial, iar cantitatea de H_2O_2 rămasă este determinată prin diferență față de o probă etalon.

Mod de lucru:

Peste 0.1 ml de sânge s-au adăugat 0.4 ml soluție tampon fosfat cu pH= 7 și 0.5 ml H_2O_2 0.16 M. După o scurtă agitare, s-a incubat 1 minut la termostat la temperatura de 25 °C. S-au adăugat apoi 2 ml de soluție de $K_2Cr_2O_7$ 1% în acid acetic glacial. Probele s-au supus apoi fierberii timp de 10 minute, apoi soluțiile s-au răcit sub jet de apă și s-au citit densitățile optice la $\lambda = 570\text{nm}$.

În paralel s-a efectuat și o probă etalon cu 0.5 ml H_2O_2 0.16M.

Calculul a fost efectuat după relația:

$$\text{activitate a catalazica } (\mu\text{MH}_2\text{O}_2 / \text{min.}, \text{ml}) = \frac{E_{\text{etalon}} - E_{\text{proba}}}{E_{\text{etalon}}} \cdot 10 \cdot \text{dilutia}$$

Determinarea activității methemoglobin reductazei (MHbr) (178)

Principiul care stă la baza determinării activității methemoglobin reductazei este transformarea integrală a hemoglobinei (Hb), prin nitrare, în methemoglobină (MHb). În timpul incubării cu lactat, methemoglobina este redusă în funcție de activitatea methemoglobin reductazei prezente. Se determină concentrația methemoglobinei la începutul incubării și după 4 ore prin determinarea densităților optice la 540nm.

Mod de lucru:

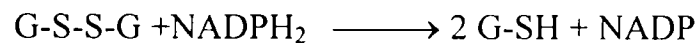
La 0.2 ml sânge heparinat, s-a adăugat soluție de nitrit în exces. După 15 minute s-a spălat de 6 ori cu soluție izotonică de NaCl 0.85%; suspensia brună de eritrocite obținută s-a suspendat apoi în 1.8 ml soluție izotonică de NaCl 0.85% și 0.2 ml soluție tampon fosfat pH=7. Din această suspensie s-au luat 1 ml și s-au introdus într-o eprubetă, peste care s-au adăugat 0.1 ml soluție de lactat de sodiu (soluție 5%). În această suspensie s-a barbotat gaz metan după care eprubeta închisă ermetic, a fost introdusă în termostat la temperatura de 37 °C unde a fost menținută timp de 4 ore.

Calculul activității methemoglobin reductazei s-a efectuat cu următoarea formulă:

$$\text{Hb redusă} = \frac{\text{Concentrație MHb după incubare}}{\text{Concentrație MHb înainte de incubare}} \times 100$$

Determinarea activității glutation-reductazei (178)

Principiul care stă la baza determinării glutation-reductazei este reacția de transformare a glutationului din forma oxidată (G-S-S-G) în forma redusă (G-SH), în prezența NADPH₂ (nicotinamid adenin dinucleotid-forma redusă) . Reacția catalizată de glutation-reductază este:



Mod de lucru:

În vederea obținerii unei mase eritrocitare cât mai pure s-au introdus 0.2 ml sânge proaspăt recoltat într-o eprubetă de centrifugă și s-a centrifugat timp de 10 minute , la 2500 rot/min , pe o centrifugă Janetzky de laborator. S-a îndepărtat supernatantul , după care a urmat o serie de 6 spălări a sedimentului eritrocitar ; fiecare spălare a fost urmată de o nouă centrifugare; spălările fiecărei probe s-au realizat cu câte 3 ml soluție izotonică de NaCl 0.85%; spălare/probă; aceste spălări au fost necesare pentru îndepărtarea totală a stromei și obținerea unui sediment eritrocitar cât mai pur;

Într-o cuvă de 0.5ml a unui spectrofotometru Specord în U.V s-au introdus 0.05 ml soluție de NADPH₂ (6mM, în tampon trietanolamină 50mM-EDTA 5 mM, pH=7.5) peste care s-au introdus 0.1 ml hemolizat . Acest amestec s-a incubat la temperatura de 25°C , timp de 1 minut, după care, reacția se declanșează adăugând în amestecul de reacție 0.1ml soluție de glutation oxidat (G-S-S-G) (75mM, în același tampon : trietanolamină-EDTA, pH=7.5). S-a înregistrat variația extincției timp de 5 minute. S-au obținut o serie de spectre din care au fost determinate activitățile glutation-reductazei la $\lambda=340\text{nm}$, în funcție de densitățile optice și de timpul de reacție (178).

Valorile normale se situează între 0.7-1.7 $\mu\text{moli/min/g Hb}$ (5).

Calculul activității enzimei glutation reductază s-a efectuat cu ajutorul formulei:

$$\mu\text{moliGSSG} / \text{min} / \text{gHb} = \frac{1125 \cdot \Delta E}{c_{\text{Hb}} \cdot \text{min}}$$

Dozarea hemoglobinei (Hb)

Pentru determinarea hemoglobinei , s-a utilizat metoda Drabkin (178), care se bazează pe transformarea hemoglobinei în cianmethemoglobină prin adăugarea de fericianură de potasiu, după care se măsoară densitatea optică la $\lambda = 540\text{nm}$.

Mod de lucru:

Într-o eprubetă s-au introdus 0.02ml sânge proaspăt recoltat, cu ajutorul unei micropipete Hagedorn; peste acesta s-au adăugat 5 ml reactiv Drabkin(0.02g% $K_3Fe(CN)_6$, 0.005g%KCN și 0.1g% $NaHCO_3$) . Pentru perfectarea reacției proba s-a lăsat 20 de minute în repaus, când s-a obținut un compus de culoare galben-roșcat; s-a citit densitatea optică la 540 nm la fotocolorimetrul Spekol, comparativ cu o probă martor și o probă etalon (soluție cu standard de cianmethemoglobină -80mg/100ml)

Conținutul de hemoglobină în g/100 ml s-a calculat cu formula :

$$gHb / 100 ml = \frac{E_{proba} - E_{martor}}{E_{etalon} - E_{martor}} \cdot c_{etalon} \cdot 10^{-3} \cdot 251$$

unde: c_{etalon} = concentrația soluției etalon (mg/100ml)

251 = reprezintă diluția sângelui (0.02 ml sânge și 5 ml reactiv Drabkin)

Valorile normale la șobolan sunt cuprinse între 11-18 g/100ml(5)

Dozarea methemoglobinei (MHb)

Methemoglobina formată sub acțiunea oxidanților prezintă un maxim de absorbție la 630 nm, care dispare când methemoglobina este transformată în cianmethemoglobină (178).

Determinările se efectuează comparând două probe:

- Proba A- constă în transformarea întregii cantități de hemoglobină în methemoglobină cu ajutorul fericianurii de potasiu , iar după adăugarea cianurii de potasiu , întreaga cantitate de hemoglobină (hemoglobină+methemoglobină) este prezentă sub formă de cianmethemoglobină.
- Proba B- se transformă doar methemoglobina prezentă în cianmethemoglobină

Mod de lucru:

0.2 ml de sânge s-au hemolizat în 5 ml apă distilată , după care proba s-a lăsat în repaus 20 de minute și s-au adăugat 5ml soluție tampon fosfat 0.016M de pH= 6.5 după care probele s-au centrifugat pe o centrifugă Janetzky de laborator, timp de 10 minute la 3500 rot/min.

Din supernatantele obținute , s-au introdus câte 3ml în câte două eprubete(A și B) pentru fiecare probă, după care s-au adăugat reactanții după cum urmează:

Reactanți	Proba A	Proba B
Supernatant (ml)	3.0	3.0
Sol. $K_3Fe(CN)_6$ 152mM (ml)	0.1	-
H ₂ O bidistilată	-	0.1

- s-au efectuat citirile densităților optice la $\lambda = 630$ nm

E_1A

E_1B

Sol. KCN 77mM (ml)	0.1	0.1
-----------------------	-----	-----

- s-au efectuat din nou citirile densităților optice, după un repaus de 5 minute, la $\lambda = 630$ nm

E_2A

E_2B

Calculul a fost efectuat după formula:

$$\% MHb = \frac{E_1B - E_2B}{E_1A - E_2A} \cdot 100$$

Valorile normale : 0.2-1% din Hb totală, %Hb : 6.9 –15.3 (5).

Dozarea proteinelor serice prin metoda Gornall

Proteinele formează cu ionul de cupru în soluție alcalină un complex de culoare violetă cu absorbție maximă la 546 nm.. S-a ales această metodă datorită faptului că ea reprezintă o tehnică simplă, expeditivă și reproductibilă , sensibilitatea ei fiind de 100 μ g.

Mod de lucru:

Într-o eprubetă s-au introdus 5ml reactiv Gornall și 0.1 ml ser pipetați cu o micropipetă Hagedorn. Amestecul de reacție s-a lăsat în repaus 30 de minute pentru dezvoltarea culorii după care s-a citit densitatea optică a probei la $\lambda = 546$ nm. În paralel s-a efectuat o probă martor cu ser fiziologic și o probă etalon în care în loc de ser s-au pipetat 0.1 ml de soluție de albumină serică bovină (0.6g /10 ml apă distilată)

Calculul s-a efectuat după următoarea formulă:

$$g \text{ proteine } / 100 \text{ ml ser} = \frac{E_{proba} - E_{martor}}{E_{etalon} - E_{martor}} \cdot c_{etalon}$$

unde $c_{etalon} = 6g/100$ ml ; Valorile normale: 5.6-7.6 mg/100ml (5).

Determinarea activității transaminazelor serice (alanin amino-transferaza

ALAT și aspartat amino-transferaza ASAT)

Prin tratare cu soluția alcalină de 2,4-dinitrofenilhidrazina , acidul piruvic format prin reacția dintre alanină , respectiv acidul aspartic și acidul α -cetoglutaric , formează

fenilhidrazonele respective. Compușii formați absorb selectiv la lungimea de undă de 540nm (178).

S-a utilizat următoarea metodă generală de lucru , pentru ambele transaminaze:

Reactivi (ml)	ALAT	ASAT
Substrat ALAT	1.0	—
Substrat ASAT	—	1.0
Ser	0.2	0.2

S-au agitat eprubetele și s-au introdus în termostat timp de 30 minute pentru ALAT, respectiv 60 minute , pentru ASAT , la temperatura de 37 °C, după care s-au adăugat

2,4-dinitrofenil hidrazină 1mM	1	1
--------------------------------	---	---

S-au lăsat probele în repaus, la temperatura camerei , pentru perfectarea reacției timp de 20 de minute, după care s-a adăugat

NaOH 0.4n	10	10
-----------	----	----

Probele au dezvoltat o culoare galben roșietică, s-au agitat și li s-au efectuat citirile la spectrofotometrul Spekol la lungimea de 540nm față de probele martor respective pentru fiecare dintre enzime. S-a utilizat de asemenea pentru fiecare enzimă o probă etalon ce a conținut soluție de piruvat de sodiu 2mM. Concentrațiile de acid piruvic rezultat, au fost comparate cu cele obținute din curba de etalonare prezentată în capitolul 5.

Calculul cantității de acid piruvic rezultat în urma reacției enzimatice a fost efectuat cu formula :

$$\mu\text{moli piruvat}/\text{min}37^{\circ}\text{C} = \frac{E_{\text{proba}} - E_{\text{martor}}}{E_{\text{etalon}}} \cdot c_{\text{etalon}} \cdot \frac{1}{t}$$

unde c_{etalon} = concentrația piruvatului de sodiu

t = timpul de termostatare (30 minute pentru ALAT ; 60 minute pentru ASAT)

6.4.1.2. Rezultate și discuții

În urma studiilor efectuate pe sângele recoltat de la șobolani tratați cu extract concentrat de *Allium sativum* s-au obținut următoarele rezultate:

6.4.1.2.1. Influența unui extract concentrat de *Allium sativum* asupra activității catalazei sanguine

Valoarea lotului martor se situează la valori cuprinse între 20.13-26.84 mg H_2O_2/gHb , în timp ce valorile catalazei la ambele loturi, atât la cel căruia i s-au administrat trei doze de extract concentrat de *Allium sativum* (AS)(0.2ml/ individ - i.m), cât și celui căruia i s-a administrat trei doze de acid ascorbic (sol.2 %- 0.5ml/individ-per os), se situează la valori cuprinse între 47-49.3 mg H_2O_2/gHb (la lotul tratat AS),cu 95% mai ridicate decât a lotului martor, respectiv 53 – 66.73 mg H_2O_2/gHb (la lotul tratat cu acid ascorbic), ceea ce reprezintă valori cu 100.8-161.7 % ori mai ridicate față de lotul martor (tabelul 6.4.1).

La o mărire a numărului de doze, valorile catalazei scad; astfel, după administrarea a 4 doze valorile catalazei se situează la valori cu 83.7 % mai mici (la lotul tratat cu AS) respectiv cu 52.2% mai mici la lotul tratat cu acid ascorbic (AA).

După administrarea a 5 doze, valorile activității catalazei se situează la valori apropiate de ale lotului martor.

În urma sistării administrării de extract respectiv de acid ascorbic, valorile activității catalazei cresc din nou, apar valori cu 48 % mai mari decât a martorului, la lotul tratat cu AS respectiv cu 71.2 %, la lotul tratat cu AA (grafic 6.4.1).

Comportarea activității catalazei la lotul tratat cu extract concentrat este aproape similară cu cea a lotului tratat cu acid ascorbic: se înregistrează o stimulare a activității catalazei de către extractul de AS, până la o acumulare a compușilor din extract care vor acționa ca inhibitori ai activității catalazice, când activitatea catalazică înregistrează valori mai mici chiar decât la lotul martor. Acest comportament denotă că extractul de *Allium sativum* are o influență asupra funcției eritrocitului similară a cu antioxidant acid ascorbic.

**Activitatea catalazei sanguine la șobolani tratați cu extract concentrat de
Allium sativum (mg H₂O₂/ gHb)**

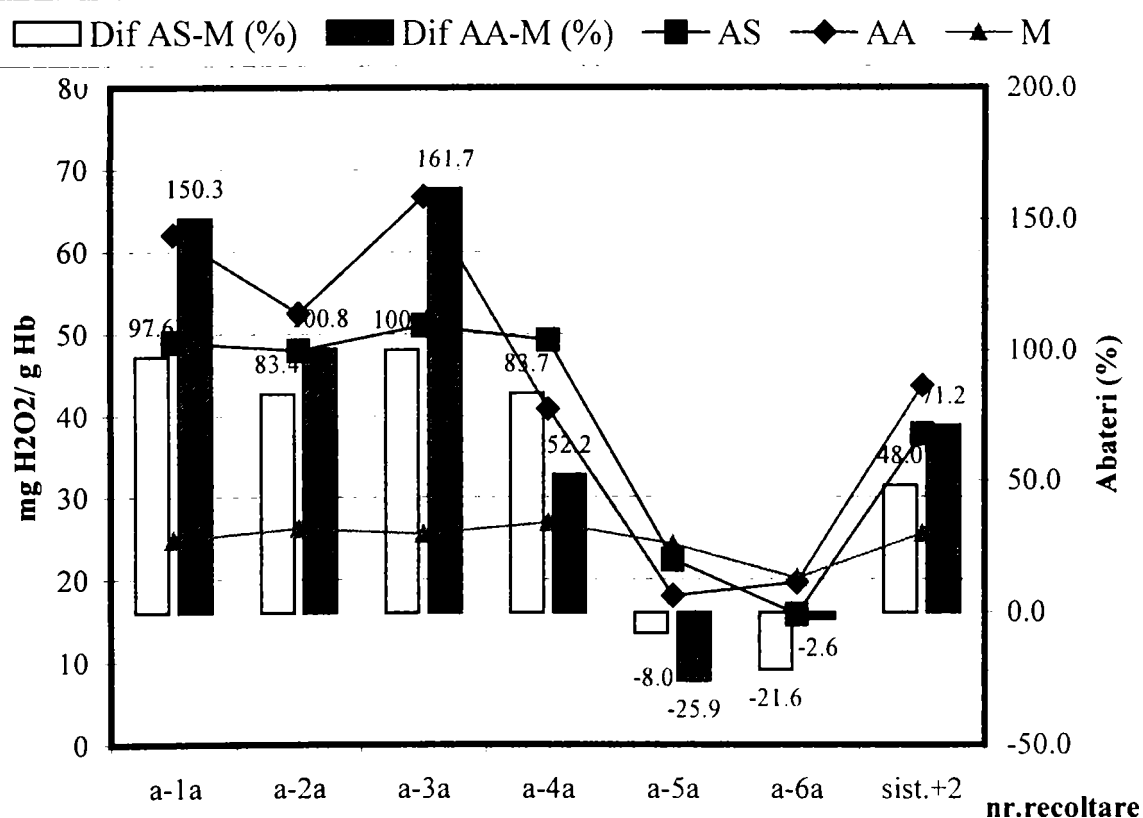
Tabelul 6.4.1.

Zile recolt.	AS	AA	M
a-1a	49.02 ± 1.23	62.09 ± 2.55	24.81 ± 1.88
a-2a	48.02 ± 1.54	52.57 ± 2.05	26.18 ± 1.43
a-3a	51.10 ± 2.33	66.73 ± 1.98	25.5 ± 1.99
a-4a	49.30 ± 1.75	40.86 ± 1.67	26.84 ± 2.01
a-5a	22.33 ± 1.05	17.98 ± 0.98	24.26 ± 1.56
a-6a	15.79 ± 1.32	19.61 ± 0.68	20.13 ± 0.98
Sist.+2	37.73 ± 1.34	43.66 ± 1.55	25.5 ± 0.87
Sist.+7	62.94 ± 1.51	82.76 ± 1.43	27.5 ± 2.03

Sist.+X = X zile de la sistarea administrării

Grafic 6.4.1

**Determinarea activității catalazei sanguine la șobolani care au fost
tratați cu extract concentrat de Allium sativum**



Dif. AS-M % = diferența în % a activității catalazice la lotul cu AS față de M

Dif. AA-M % = diferența în % a activității catalazice la lotul cu AA față de M

6.4.1.2.2. Influența extractului concentrat asupra activității methemoglobin reductazei

Activitatea methemoglobin reductazei (MHb reductazei) la lotul martor se situează la valori cuprinse între 8.26 ± 0.17 și 13.23 ± 0.26 %/h (tabelul 6.4.2).

În ceea ce privește dinamica activității MHb reductazei, pe tot parcursul experimentului , se înregistrează o evoluție în paralel a lotului tratat cu extract concentrat de AS și a celui tratat cu soluție de AA;

Astfel, după primele două doze, valorile activității MHb reductazei se găsesc la valori apropiate de cele ale martorului, pentru ca, odată cu creșterea dozei – 3 respectiv 5 doze- să se observe o creștere bruscă a activității MHb reductazei, cu 119.1% mai mare decât a lotului martor în cazul lotului tratat cu AS respectiv o creștere cu 98.3 % pentru lotul AA, după trei doze, pentru ca după cea de-a cincea doză, activitatea MHb reductazei să se apropie de valori cu 97.3% mai mari față de lotul martor, pe când , la lotul cu acid ascorbic creșterea marcantă să se observe la cea de-a cincea doză (199%).

După 6 doze administrate, la ambele loturi se observă o reducere a activității enzimei, ca în urma sistării administrării , atât a extractului cât și a soluției de acid ascorbic se observă o revenire a activității MHb reductazei la lotul cu AA, la valorile martorului(10.75 %/h), spre deosebire de AS care are un efect de diminuare a acțiunii MHb reductazei sub nivelul lotului martor(7.84 %/h – cu 27.1 % mai mică).

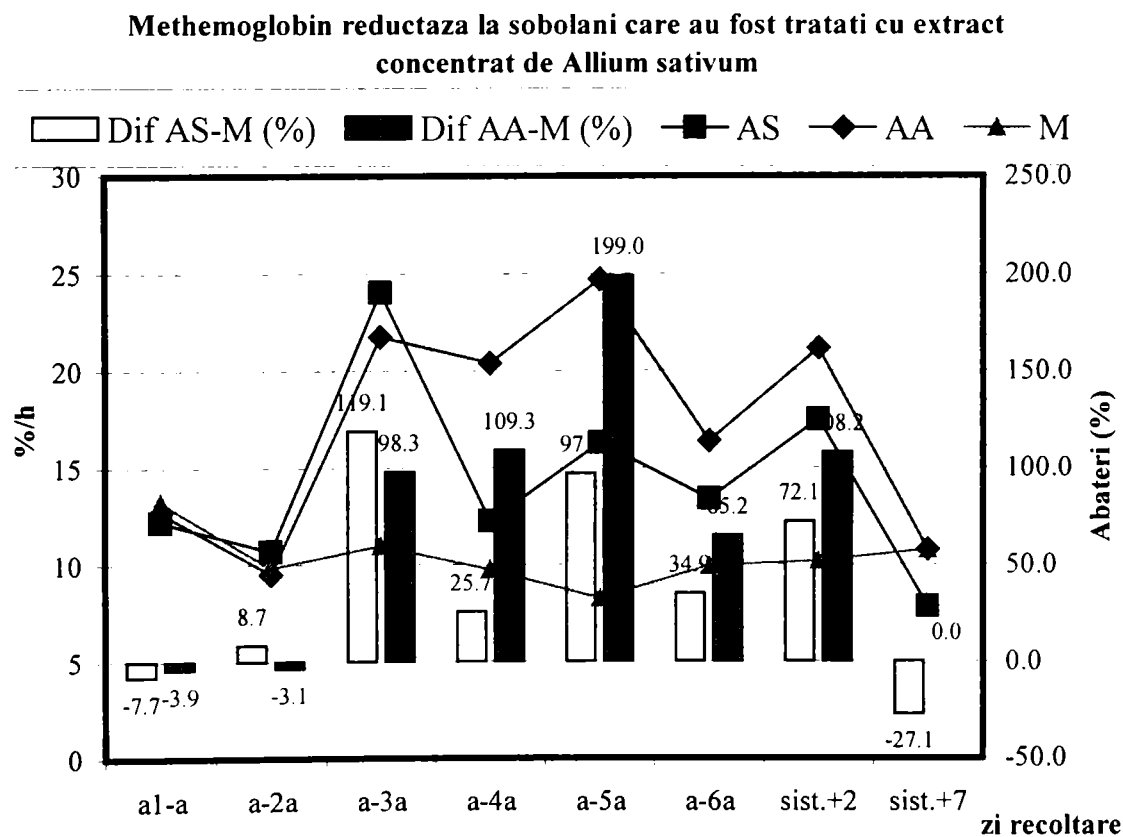
În concluzie , comparativ cu acțiunea stimulatorie imediată, atât la extractul de *Allium sativum* cât și a acidului ascorbic asupra activității catalazei, comportamentul acestora față de activitatea methemoglobin reductazei este diferită , și anume : se observă o diminuare a activității enzimei, la ambele loturi , după primele două doze, pentru ca după o anumită acumulare de substanțe administrate , activitatea enzimei să crească ; Sistarea administrării de extract concentrat , conduce la o diminuare cu 27.1 % față de martor , respectiv față de lotul căruia i s-a administrat acid ascorbic.

**Activitatea methemoglobin reductazei sanguine la șobolani tratați cu
extract concentrat de Allium sativum**

Tabelul 6.4.2

Zile recolt.	MHb reductaza (%/h)		
	AS	AA	M
a-1a	12.21 ±0.11	12.72±0.41	13.23±0.34
a-2a	10.71±0.71	9.54±0.27	9.85±0.22
a-3a	24.06±0.44	21.77±0.44	10.98±0.54
a-4a	12.26±0.43	20.41±0.43	9.75±0.33
a-5a	16.30±0.22	24.70±0.22	8.26±0.45
a-6a	13.40±0.32	16.40±0.44	9.93±0.34
Sist.+2	17.50±0.76	21.17±0.22	10.17±0.12
Sist.+7	7.84 ±0.17	10.75±0.60	10.75±0.23

Grafic 6.4.2



6.4.1.2.3. Influența unui extract concentrat de *Allium sativum* asupra activității glutathion reductazei

Glutathion reductaza se dovedește a fi enzima cea mai afectată de administrarea extractului de *Allium sativum*.

Spre deosebire de celelalte două enzime glutathion reductaza manifestă un comportament total antagonist. Astfel la lotul tratat cu extract concentrat de AS, se înregistrează valori de 4.77-5.71 UI în primele 5 zile de administrare, valori ale activității glutathion reductazei cu o medie de 45% mai scăzute față de martor.

La lotul tratat cu acid ascorbic activitatea glutathion reductazei înregistrează un comportament total opus; astfel, după primele 3 doze de AA, activitatea glutathion reductazei este cu 17% mai ridicată (tabelul 6.4.3 și graficul 6.4.3).

Odată cu mărirea dozei, activitatea glutathion reductazei crește cu 81.8 % față de lotul martor, pentru ca apoi să scadă din nou, dar activitatea se menține la valori cu 32 % mai crescute.

La sistarea administrării extractului de AS și de AA, activitatea enzimei, după ce a atins valori similare cu cele ale martorului, după 7 zile crește la ambele loturi cu 7%.

Se poate concluziona că o creștere a dozei de AS concentrat, inhibă activitatea glutathion reductazei în paralel cu stimularea activității MHB reductazei, respectiv a catalazei, pentru ca prin micșorarea cantității de extract din sânge, ambele tipuri de soluții administrate, să acționeze ca stimulatoare a celor 3 enzime.

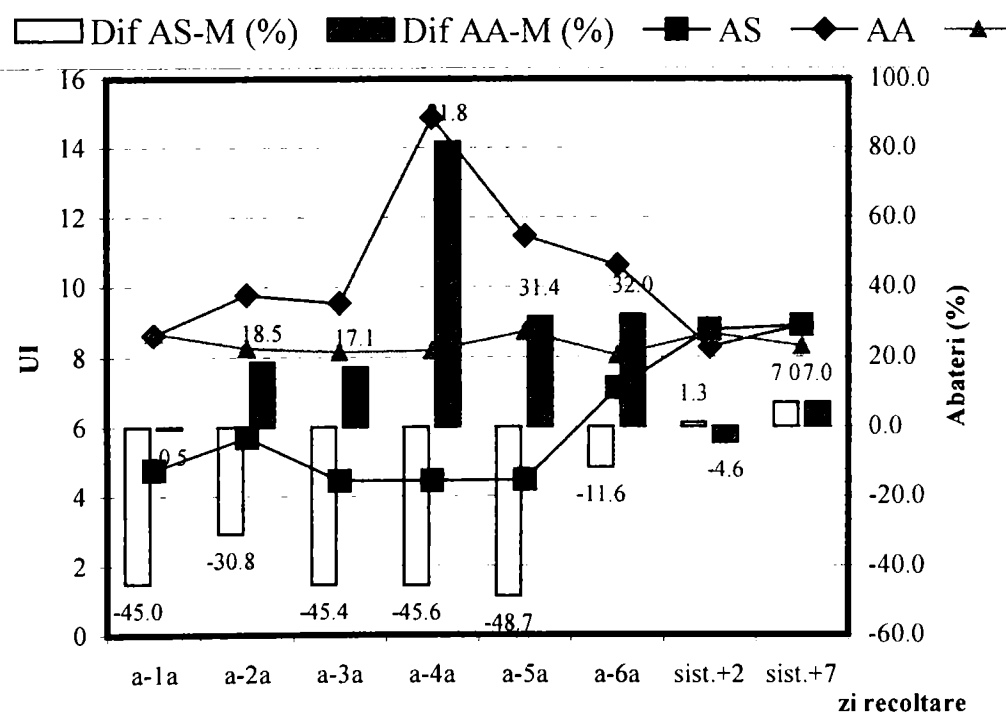
**Activitatea glutation reductazei sanguine la șobolani tratați cu extract
concentrat de *Allium sativum***

Tabelul 6.4.3

Ziua recolt.	Glutation reductaza (UI)		
	AS	AA	M
a-1a	4.77±0.21	8.64±0.32	8.68±0.32
a-2a	5.71±0.34	9.78±0.56	8.25±0.44
a-3a	4.45±0.43	9.54±0.65	8.15±0.11
a-4a	4.45±0.37	14.87±0.56	8.18±0.35
a-5a	4.47±0.43	11.46±0.62	8.72±0.24
a-6a	7.11±0.65	10.61±0.45	8.04±0.33
Sist.+2	8.78±0.34	8.27±0.53	8.67±0.65
Sist.+7	8.89±0.25	8.89±0.31	8.31±0.12

Grafic 6.4.3

**Glutation reductaza la șobolani care au fost tratați cu extract
concentrat de *Allium sativum***



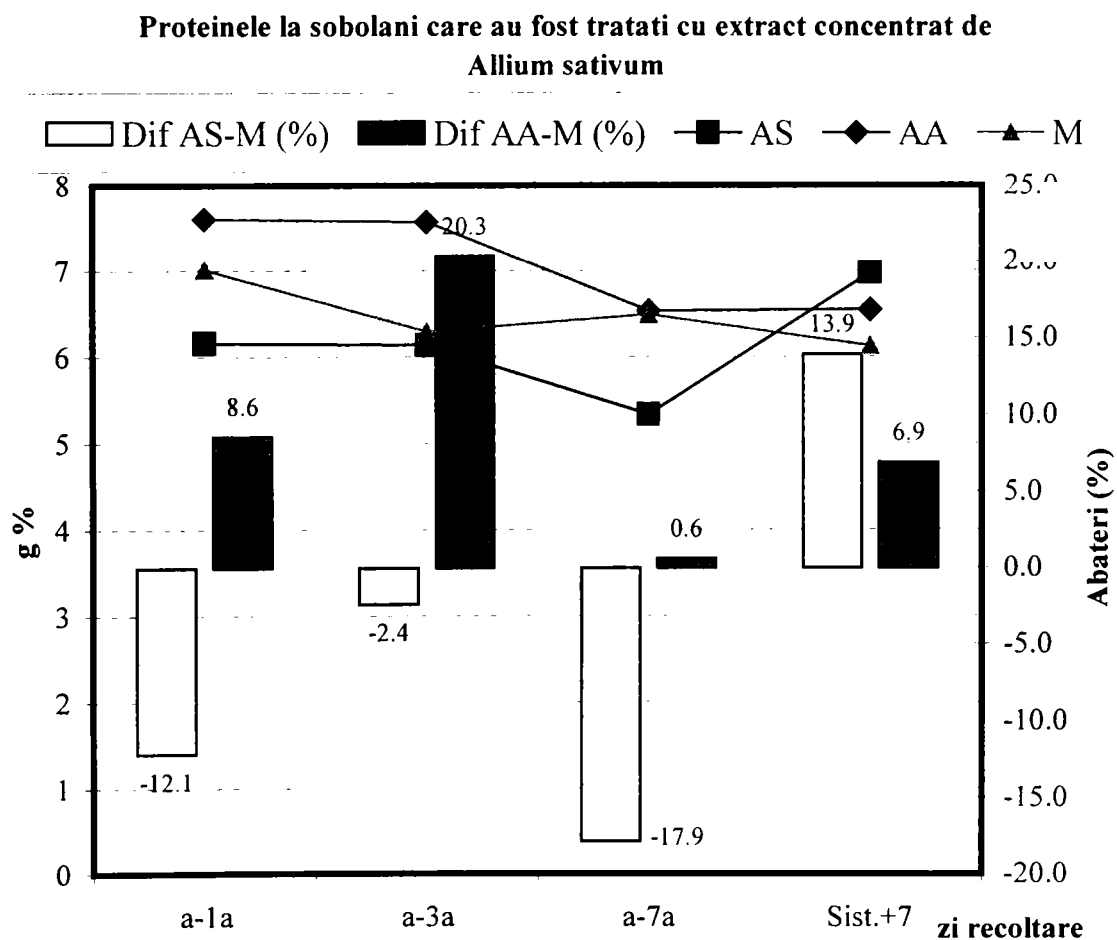
6.4.1.2. 4. Influența unui extract concentrat de *Allium sativum* asupra proteinemiei

Valoarea proteinelor totale după prima doză (tabelul 6.4.4, graficul 6.4.4), respectiv a treia doză, la toate cele trei loturi se situează la valori asemănătoare celor din literatura de specialitate: $6.49 \pm 0,39$ g/100 ml (5).

Tabelul 6.4.4

Ziua recolt.	Proteinemia g%		
	AS	AA	M
a-1a	6.16 ± 0.69	7.61 ± 0.23	7.01 ± 0.55
a-3a	6.14 ± 0.22	7.57 ± 0.43	6.29 ± 0.34
a-7a	5.33 ± 0.44	6.53 ± 0.35	6.49 ± 0.21
Sist.+ 7 zile	6.97 ± 0.22	6.54 ± 0.11	6.12 ± 0.33

Grafic 6.4.4



După administrarea a 7 doze , valoarea proteinelor scade cu 17.9% la lotul căruia i s-a administrat extract de *Allium Sativum*, față de valorile din literatura de specialitate.

În urma sistării administrării - după 14 zile - valorile proteinelor revin la normal și chiar depășind valorile lotului martor cu 13.9 %.

La lotul tratat cu acid ascorbic(soluție 2 %), după primele 3 doze, proteinemia prezintă o creștere cu 20.3 % față de valoarea martorului, pentru ca la 7 zile de la sistarea administrării, proteinemia să prezinte o valoare medie de 6.54 ± 0.50 g %, cu 6.9 % mai ridicate față de a martorului.

Scăderea proteinemiei la lotul tratat cu extract concentrat de *Allium sativum* se poate explica prin faptul că în concentrații și doze mari , extractul concentrat acționează ca un toxic, inhibând sinteza de proteine.

6.4.1.2.5. Influența extractului concentrat de *Allium sativum* asupra hemoglobinemiei

Rezultatele determinărilor sunt prezentate în tabelul 6.4.5 și graficul 6.4.5.

Activitatea celor trei enzime se repercutează și asupra valorilor hemoglobinemiei.

Prin urmărirea acestui parametru se observă următoarele: în cazul lotului tratat cu extract concentrat de AS , hemoglobinemia suferă o scădere de la 11.04 ± 0.032 după prima doză, la 6.99 ± 0.006 după cea de a treia doză , pentru ca după o ușoară revenire, la valori ce se situează la nivelul valorilor normale , la două zile de la sistarea administrării, hemoglobina să scadă la valori de 6.44 ± 0.052 g %, cu 36.9 % mai scăzută față de martor.

Acidul ascorbic are o influență pozitivă asupra hemoglobinemiei , valorile acesteia se situează la limita superioară a valorilor de referință din literatura de specialitate (12.95 ± 0.082) pentru ca apoi, după sistarea administrării, Hb să sufere o scădere importantă , până la valori cu 34.5 % mai scăzute față de lotul martor care prezintă o valoare medie de $11.3 \pm 0,004$.

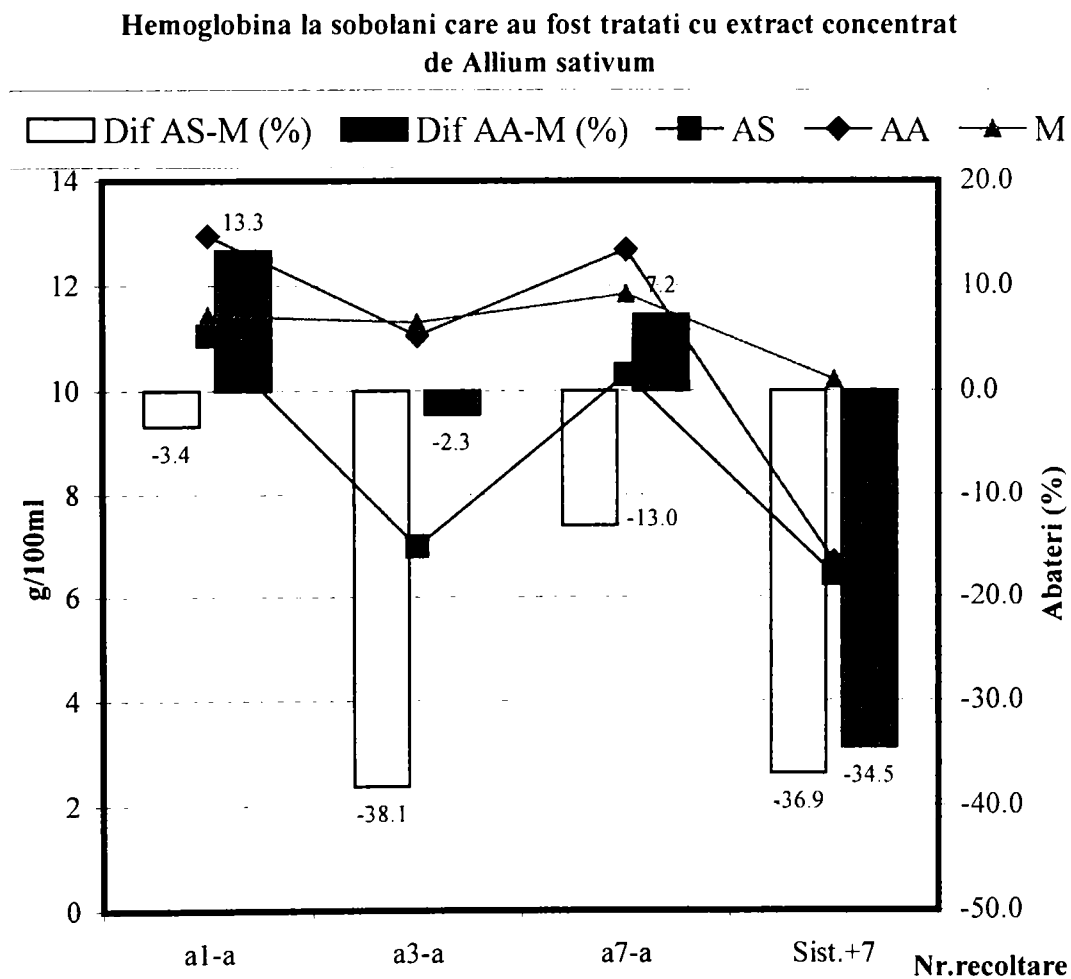
Cauza acestor scăderi și ale hemoglobinei s-ar putea datora unor deficiențe în sinteza hemului datorită nivelului scăzut al sideremiei.

**Valorile medii ale hemoglobinemiei sanguine la șobolani tratați cu extract
concentrat de *Allium sativum***

Tabelul 6.4.5.

Ziua recolt.	Hemoglobina g%		
	AS	AA	M
a- 1a	11.04±0.69	12.95±0.03	11.43±0.043
a- 3a	6.99±0.022	11.04±0.05	11.3±0.049
a- 7a	10.3±0.05	12.69±0.03	11.84±0.01
Sist.+ 7 zile	6.44±0.056	6.69±0.032	10.21±0.056

Graficul 6.4.5



6.4.1.6. Influența unui extract concentrat de *Allium sativum* asupra methemoglobinemiei (MHb)

Dinamica MHb poate fi corelată cu cea a hemoglobinemiei. Astfel, la lotul tratat cu extract concentrat de *Allium sativum* se observă o creștere proporțională a MHb cu scăderea hemoglobinemiei.

După primele trei doze de extract, methemoglobinemia se găsește la valori de 0.065 ± 0.002 g % cu 103.1 % mai cescute față de valoarea martorului, care înregistrează o valoare medie de 0.032 ± 0.001 g%. Pe măsură ce numărul dozelor crește, se observă o diminuare a MHb, la o valoare medie de 0.019 ± 0.001 g% cu 51.3% mai scăzută decât a martorului (0.039 ± 0.001 g%).

Acidul ascorbic nu are o acțiune la fel de drastică ca și a extractului concentrat, valorile MHb situându-se după primele trei doze la valori apropiate de ale martorului. În schimb, după 7 administrări, MHb suferă o reducere puternică, cu 64.1% față de a martorului, situație ce se regăsește într-o creștere concomitentă (tot după administrarea a 7 doze) a hemoglobinemiei (tabelul 6.4.5).

Aceeași corelare se poate face și cu o creștere concomitentă a activității methemoglobin reductazei, la lotul tratat cu acid ascorbic , a cărei activitate este vizibil stimulată de acidul ascorbic, având drept consecință valori mai scăzute ale methemoglobinemiei, respectiv mai ridicate ale hemoglobinemiei.

O acțiune antagonistă cu cea a AA se poate observa la lotul tratat cu extractul de AS.

Asfel, o activitate mai scăzută a catalazei și a MHb reductazei , implică o scădere a cantității de hemoglobină respectiv o creștere a cantității de methemoglobină (tabelul 6.4.5. , tabelul 6.4.6 , graficul 6.4.6).

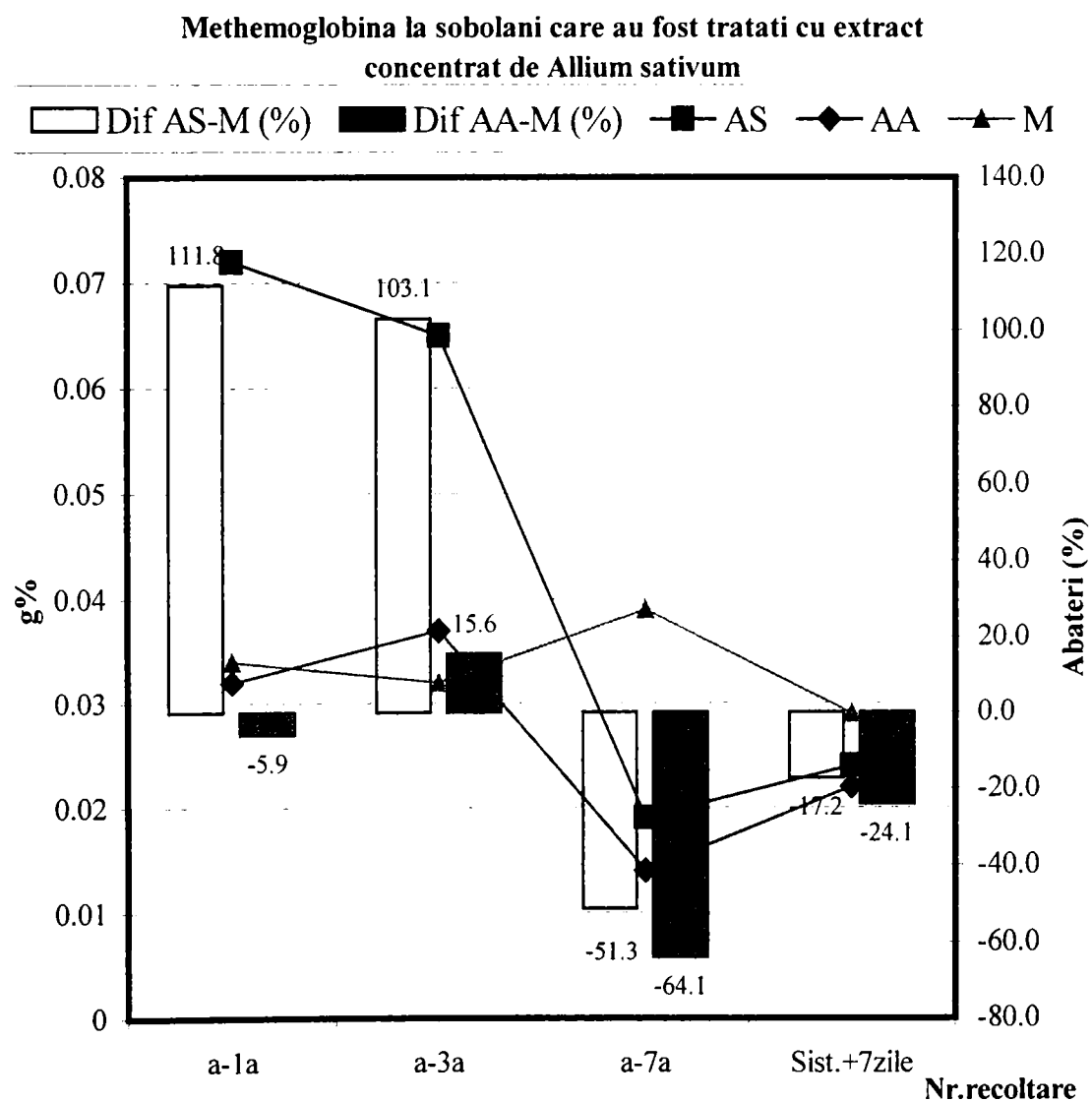
Aceste observații sunt în concordanță cu datele din literatură (310)

Valorile medii ale methemoglobinemiei sanguine la șobolani tratați cu extract concentrat de *Allium sativum*

Tabelul 6.4.6.

Nr.recoltare	Methemoglobina g%		
	AS	AA	M
a 1-a	0.072±0.004	0.032±0.003	0.034±0.007
a 3-a	0.065±0.002	0.037±0.001	0.032±0.001
a 7-a	0.019±0.001	0.014±0.003	0.039±0.009
Sist.+7 zile	0.024±0.002	0.022±0.005	0.029±0.001

Graficul 6.4.6



6.4.1.7. Influența unui extract concentrat de *Allium sativum* asupra sideremiei

Valoarea sideremiei prezintă un aspect diferit față de evoluția proteinemiei (tabelul 6.4.4.), și anume: după prima doză administrată, la lotul cu AS se observă o creștere a valorilor sideremiei (cu 9%) față de lotul martor.

După administrarea a 3 doze, respectiv a 7 doze se petrece un fenomen invers și anume, datorită concentrațiilor crescute în sânge atât de extract cât și de acid ascorbic, acestea conduc la o scădere a sideremiei cu 45.2 %(AS) respectiv 48.7% (AA), ceea ce se observă și din valorile obținute (tabelul 6.4.7.). Această influență negativă se menține la lotul cu AS, chiar și la 7 zile de la sistarea administrării; se observă o scăderea valorilor sideremiei cu până la 59.7%.

La lotul tratat cu acid ascorbic se observă un comportament similar cu al lotului tratat cu extract de *Allium sativum* (scăderea sideremiei înregistrează o scădere de până la 47.6%) (graficul 6.4.7).

Scăderea sideremiei se accentuează pe măsură ce cresc dozele administrate, astfel că și după sistarea administrării de extract concentrat, nivelul sideremiei să se găsească la o valoare de 42.5 $\mu\text{g Fe \%}$ cu 59.7% mai scăzută decât valoarea martorului.

Scăderea sideremiei s-ar putea explica prin captarea fierului în macrofagele activate din splină sau măduva hematogenă, observații ce sunt confirmate și de determinările efectuate pe organele de șobolan.

În concluzie, ca urmare a studiului parametrilor biochimici (6.4.1.1-6.4.1.7) se poate afirma că extractul concentrat de *Allium sativum* acționează ca o substanță methemoglobinizantă ceea ce conduce la apariția de corpi Heinz .

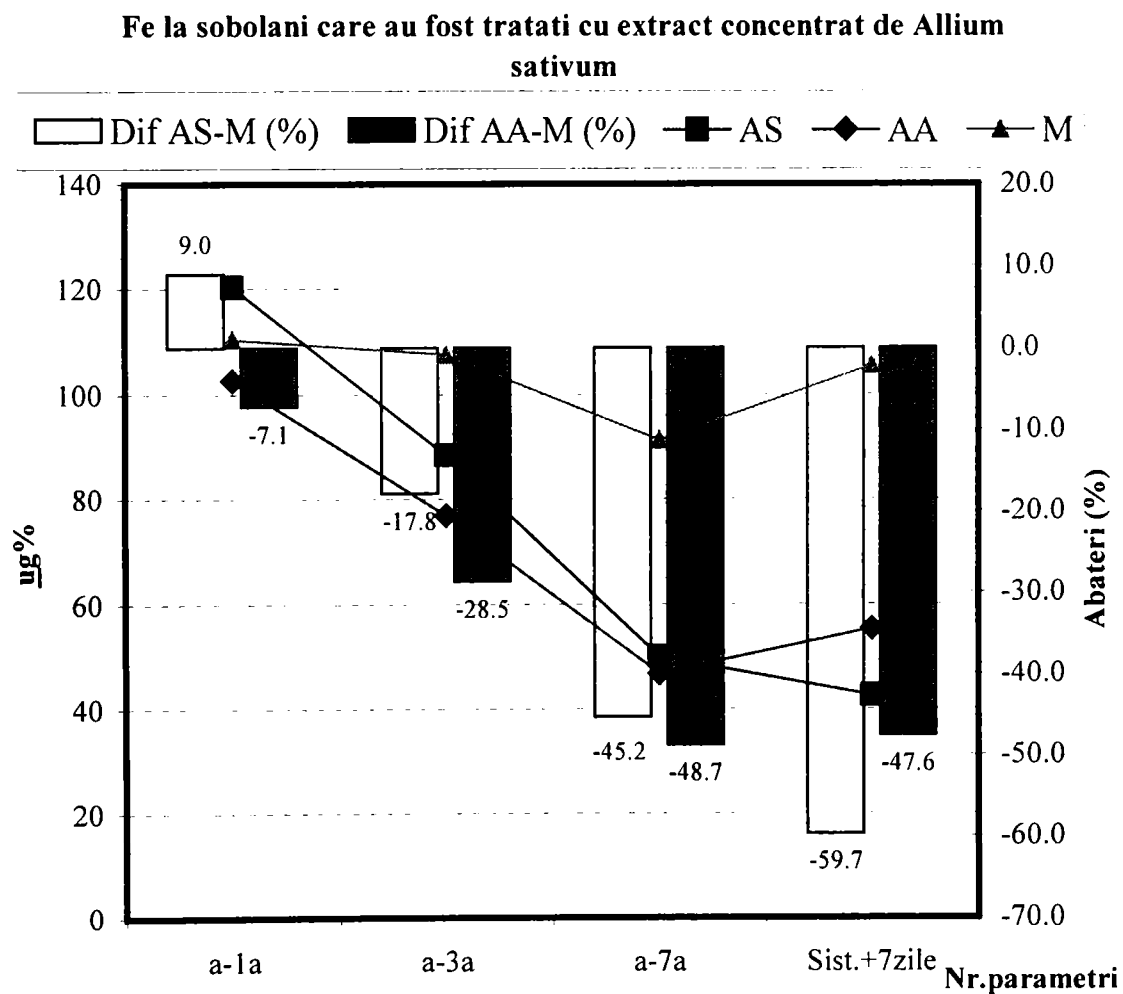
Dinamica parametrilor biochimici studiați se corelează și cu activitatea enzimelor oxidoreducătoare prezentate anterior. Aceste enzime, la lotul tratat cu extract concentrat de *Allium sativum* , prezintă o activitate total antagonistă cu a celor de la lotul tratat cu acidului ascorbic, astfel că valoarea crescută a MHb, ce apare concomitent cu creșterea dozelor de extract concentrat de AS, se poate explica prin insuficiența mecanismelor reducătoare, ceea ce conduce la acumularea de MHb în eritrocite, în cantități patologice, rezultând methemoglobinemie manifestă.

**Valorile medii ale sideremiei sanguine la șobolani tratați cu extract
concentrat de Allium sativum**

Tabelul 6.4.7.

Nr.recoltare	Fe $\mu\text{g}/\text{ml}$ sânge		
	AS	AA	M
a 1-a	120.4 \pm 2.54	102.6 \pm 2.76	110.48 \pm 2.23
a 3-a	88.40 \pm 1.33	76.9 \pm 3.44	107.60 \pm 3.44
a 7-a	50.00 \pm 2.56	46.8 \pm 5.11	91.30 \pm 5.22
Sist.+ 7 zile	42.50 \pm 4.55	55.3 \pm 2.71	105.48 \pm 5.34

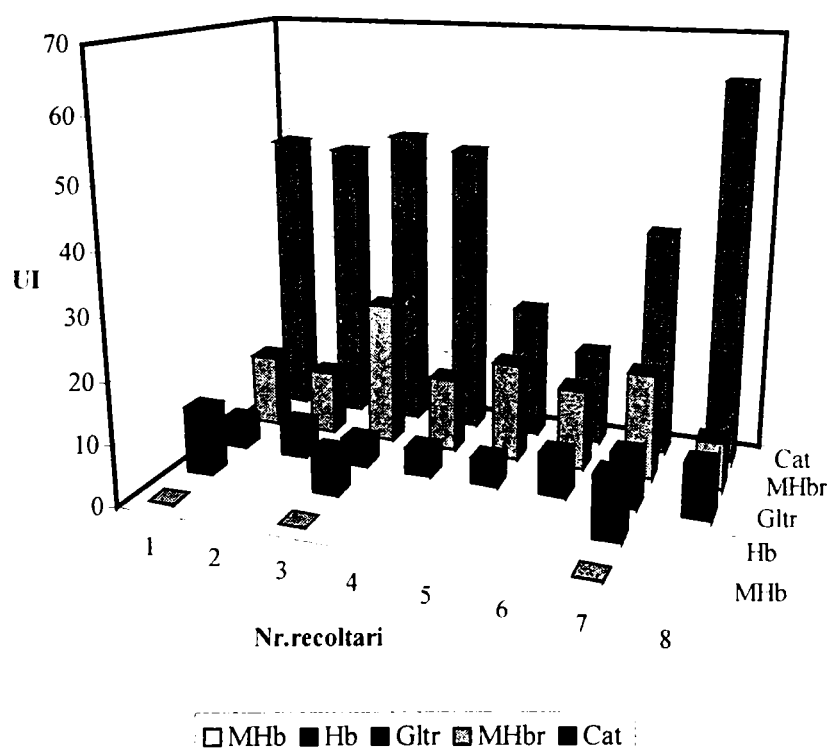
Graficul 6.4.7.



Reprezentarea corelațiilor activităților oxidoreductazelor cu valorile hemoglobinemiei și methemoglobinemiei este redată în graficul 6.4.8

Grafic 6.4.8.

Reprezentarea corelațiilor activităților oxidoreductazelor cu valorile hemoglobinemiei și methemoglobinemiei



În cazurile în care hemoglobina este instabilă, se poate forma methemoglobină, care de obicei pierde hemul din lanțul β și se leagă de alte hemoglobine denaturate, de glutatation sau de alte substanțe din eritrocit. Agregatele formate se leagă de aceasta prin legături disulfurice, de grupele tiol, ceea ce are ca efect alterarea permeabilității membranei eritrocitelor. Grupele tiol blocate determină perturbarea "pompei de ioni" și creșterea permeabilității membranei (310)

6.4.1.8. Influența extractului concentrat de *Allium sativum* asupra transaminazelor serice

În vederea stabilirii gradului de afectare a ficatului prin administrarea extractului de *Allium sativum* pe aceleași loturi prezentate mai sus, au fost efectuate și determinările activității alanin aminotransferazei (ALAT) cât și a aspartat amino transferazei (ASAT).

În urma determinărilor efectuate s-a observat o dependență între numărul dozelor administrate și dinamica activității ALAT(226).

Astfel , în urma administrării primei doze de extract concentrat s-a înregistrat o valoare de 30.7 ± 0.27 UI ceea ce reprezintă o valoare ce se situează în limitele normale din literatura de specialitate, dar cu 14 % mai scăzută față de lotul martor; la lotul tratat cu acid ascorbic se înregistrează o scădere a activității enzimei cu 58 % mai scăzută decât a lotului martor.

Pe măsură ce crește doza de AS administrată, crește și activitatea enzimei ALAT , astfel că după 7 doze , se înregistrează o creștere cu 118.5 % față de lotul martor ; spre deosebire de aceasta , la lotul tratat cu acid ascorbic se remarcă o creștere mult diminuată a activității ALAT, de numai 6.3 % față de lotul martor.

La 7 zile de la sistarea administrării, activitatea enzimei ALAT crește în continuare la lotul tratat cu AS, atingând o valoare cu 150.3 % mai mare decât a lotului martor.

Se poate concluziona că extractul de AS afectează în mod evident funcțiile normale ale hepatocitului.

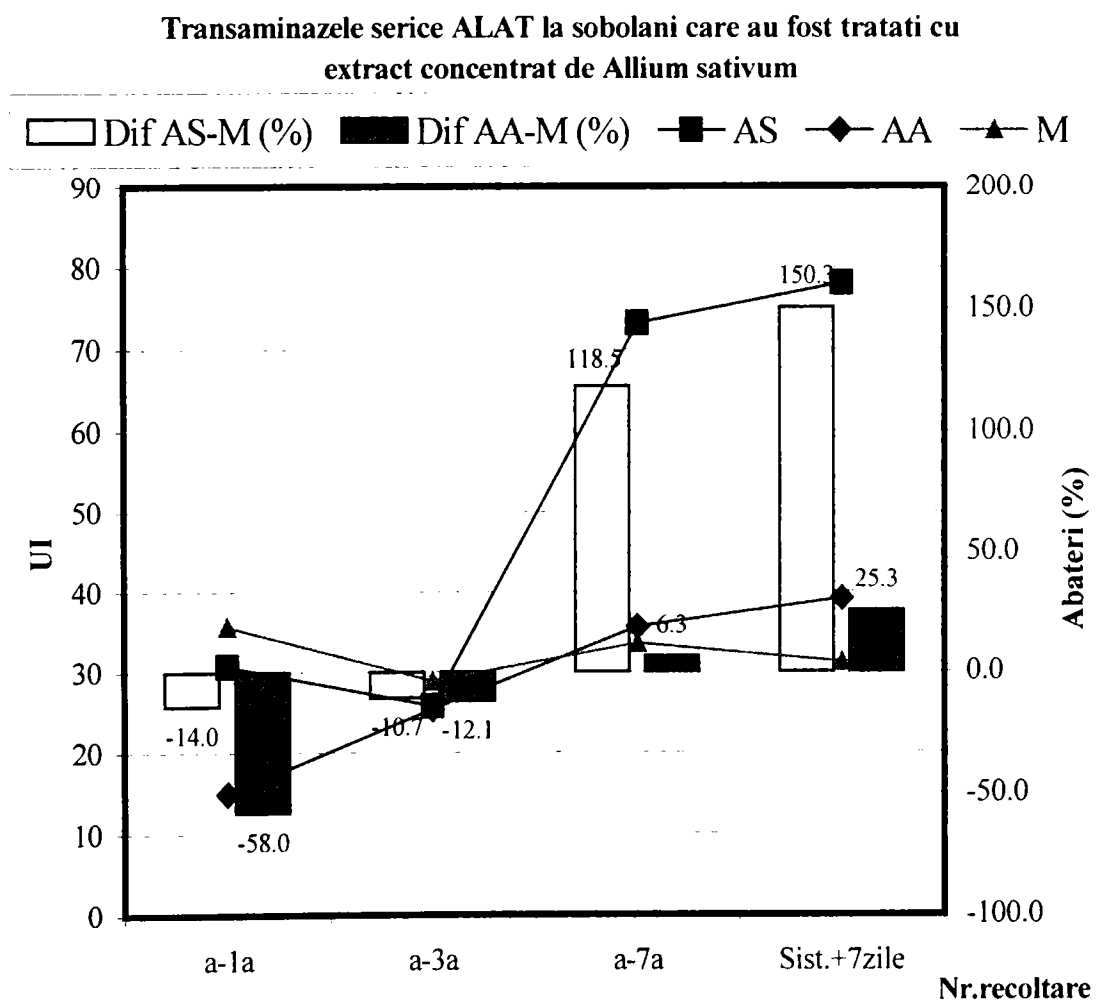
Rezultatele sunt prezentate în tabelul 6.4.8 și graficul 6.4.9.

**Valorile medii ale activității alanin aminotransferazei (ALAT) la șobolani
tratați cu extract concentrat de *Allium sativum***

Tabelul 6.4.8

Nr.recoltare	ALAT (UI)		
	AS	AA	M
a 1-a	30.7±0.27	15±0.15	35.7±0.30
a 3-a	25.8±1.12	25.4±0.91	28.9±0.83
a 7-a	73.2±2.33	35.6±0.93	33.5±0.19
Sist.+7 zile	78.1±2.02	39.1±1.69	31.2±1.50

Graficul 6.4.9



O evoluție asemănătoare se înregistrează și la enzima aspartat amino transferaza.

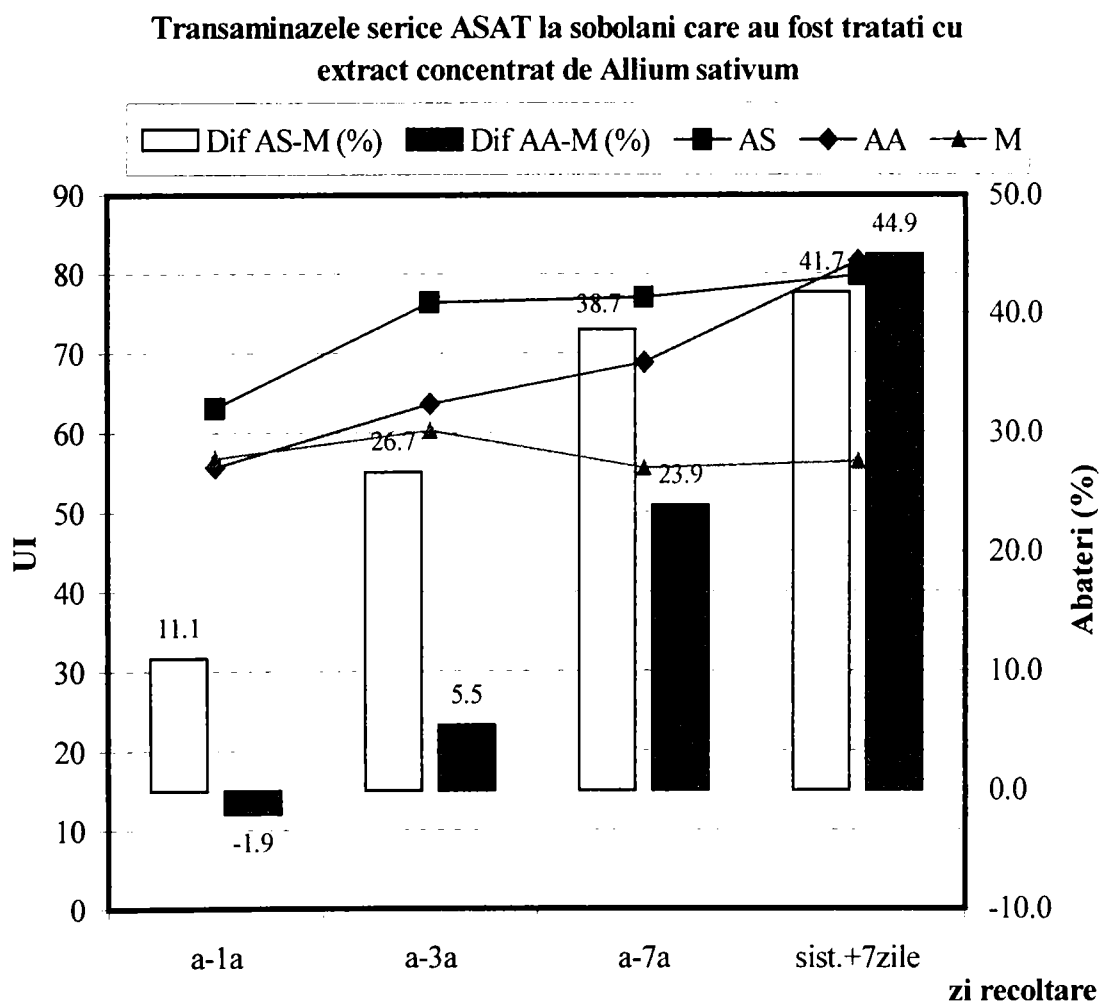
Rezultatele sunt redată în tabelul 6.4.9 și graficul 6.4.10

Valorile medii ale activității aspartat amino transferazei(ASAT) la șobolani tratați cu extract concentrat de *Allium sativum*

Tabelul 6.4.9

Nr.recoltare	ASAT (UI)		
	AS	AA	M
a 1-a	63.1±1.34	55.7±1.72	56.8±2.07
a 3-a	76.4 ±2.15	63.6±1.97	60.3±2.01
a 7-a	77±1.89	68.8±1.22	55.53±3.01
Sist.+7 zile	79.8±1.75	81.6±2.30	56.3±3.20

Graficul 6.4.10.



Din graficul 6.4.10. se poate observa o similitudine în evoluția activității ASAT cu a enzimei ALAT, dar totuși nu se remarcă o influență așa de drastică la această enzimă. Astfel, în urma administrării primei doze se înregistrează o valoare de 63.1 ± 1.34 UI , care se situează la valori ușor mai ridicate , cu 11.1 % , față de lotul martor.

Crescând doza , se observă o creștere destul de lentă a activității enzimei, astfel că după cinci zile ASAT înregistrează o creștere cu 38.7 % . Această stimulare a activității ASAT se manifestă și după sistarea administrării extractului; se înregistrează o creștere cu 41.7 % față de valoarea martorului.

Lotul tratat cu acid ascorbic manifestă deasemenea o stimulare a activității ASAT , dar la valori mai mici ; creșterile se produc în mod constant odată cu mărirea dozei , atingând și aceasta, după sistarea administrării o valoare cu 44.9 % mai mare decât a lotului martor.

Raportul de Rittis , care în mod normal are o valoare de 1.3 , înregistrează la lotul căruia i s-a administrat extract concentrat o valoare de 1.1 , ceea ce reprezintă o manifestare toxică clară asupra ficatului, manifestată printr-o reacție de citoliză a acestuia.

Aceste valori sunt confirmate și de examenele histologice ale ficatului, splinei și rinichiului, rezultatele cărora vor fi prezentate ulterior , în subcapitolul 6.4.4.

În ceea ce privește rezultatele obținute la testarea extractului diluat de *Allium sativum*, acestea sunt prezentate în continuare în subcapitolul 6.4.2.

6.4.2. Influența unui extract diluat asupra unor enzime oxidoreducătoare (catalaza, methemoglobin reductaza, glutation reductaza) și a unor parametrii biochimici în corelație cu oxidoreductazele.

Rezultatele anterioare, obținute prin administrarea unui extract concentrat de *Allium sativum*, au permis continuarea lucrărilor și studierea aceluiași parametri în cazul administrării unui extract diluat, comparativ cu un lot tratat cu o soluție de acid ascorbic 1%, respectiv a unui lot martor

6.4.2.1. Material și metodă

Experimentul a fost efectuat asupra a 150 de șobolani de linie Wistar, împărțiți în trei loturi de șobolani, a câte 50 de indivizi fiecare. Loturile au fost omogene în ceea ce privește greutatea, vârsta și sexul animalelor.

Șobolani au fost menținuți tot timpul experimentului în condiții corespunzătoare atât din punct de vedere al microclimatului cât și al calității furajelor.

Administrările au fost efectuate zilnic, la cele trei loturi, timp de șapte zile, după cum urmează:

- Lotului 1 i s-au administrat per os 0,5 ml extract diluat de *Allium sativum* (0.118g tiosulfinați / 100g material crud ceea ce corespunde unei doze de 3.5mg tiosulfinați/kgcorp/zi) (AS);
- Lotului al 2-lea i s-a administrat per os 0,5 ml soluție 1% de acid ascorbic (20 mg acid ascorbic/kgcorp/zi) (AA),
- Lotului al 3-lea i s-a administrat per os 0,5 ml apă distilată (lot martor-M).

S-au efectuat sacrificări de câte 5 indivizi, din fiecare lot, zilnic, până în ziua a șaptea a experimentului apoi, după sistarea administrării, a 2-a respectiv a 5-a zi.

Înainte de sacrificare s-a recoltat sânge pe anticoagulant Heparină(5000 UI), prin puncție cardiacă; s-au recoltat și următoarele organe (ficat, rinichi și splină) de la fiecare individ.

6.4.2.2. Rezultate și discuții

În urma studiilor efectuate pe sângele recoltat de la șobolani tratați cu extract diluat de *Allium sativum* s-au obținut următoarele rezultate:

6.4.2.2.1. Influența unui extract diluat de *Allium sativum* asupra activității catalazei sanguine

Activitatea catalazei în cazul martorului se situează la valori cuprinse între 21-25.9 mg H₂O₂/g Hb (tabelul 6.4.10 și graficul 6.4.11).

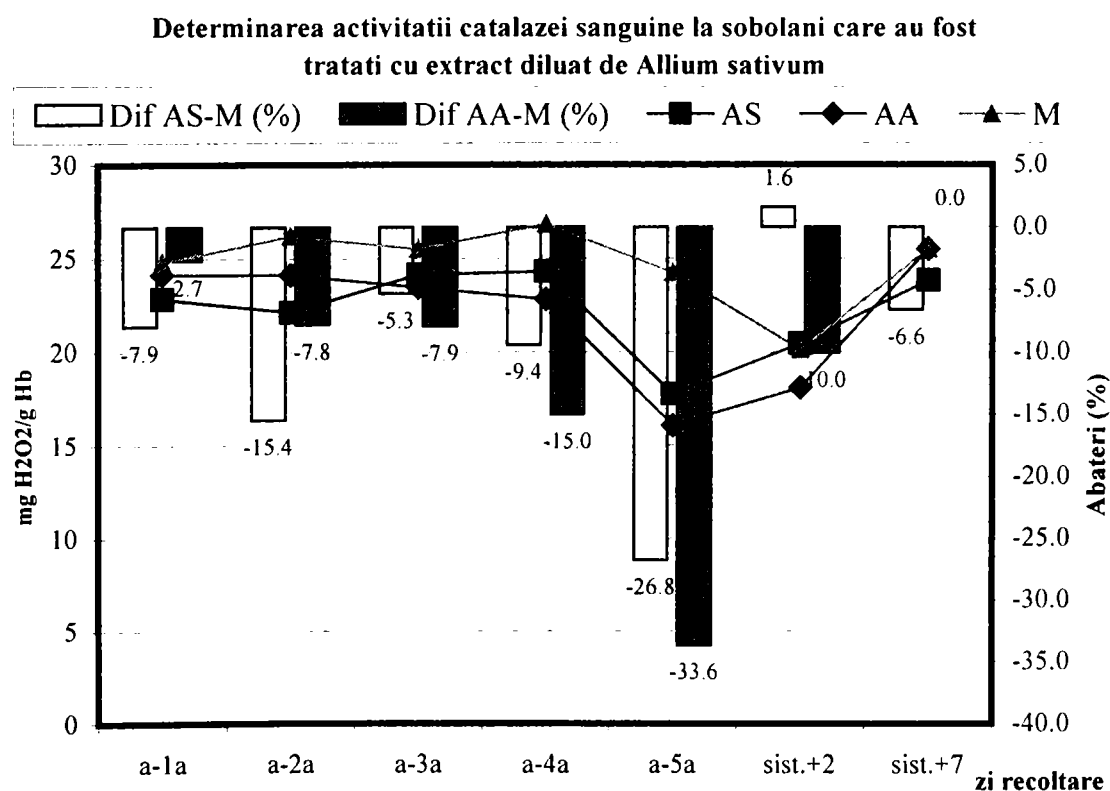
Activitatea catalazei sanguine la șobolani tratați cu extract diluat de AS se situează , pe tot parcursul administrării extractului la valori sub valorile martorului, scăderea variind între 7.9 și 15% față de martor până la administrarea a 4 doze, pentru ca după a 5 a doză activitatea enzimei să fie diminuată cu 26.8 %. În urma sistării administrării extractului, activitatea catalazei se situează la valori ce se apropie de valoarea martorului (23.82 ± 0.32 mg H₂O₂/g Hb).

Valorile medii ale activității catalazei, la șobolani tratați cu extract diluat de Allium sativum

Tabelul 6.4.10

Zi recoltare	Catalaza (mg H ₂ O ₂ /g Hb)		
	AS	AA	M
a-1a	22.85±3.44	24.15±2.11	24.81±1.11
a-2a	22.15±1.23	24.15±0.53	26.18±0.42
a-3a	24.15±1.56	23.48±0.79	25.5±0.76
a-4a	24.32±2.54	22.82±0.69	26.84±0.33
a-5a	17.77±0.93	16.1±0.54	24.26±0.71
Sist.+2	20.45±1.22	18.11±0.66	20.13±0.78
Sist.+7	23.82±3.01	25.5±1.87	25.5±1.07

Graficul 6.4.11



Un efect similar de reducere a activității catalazei se înregistrează și la lotul tratat cu acid ascorbic, totuși o reducere mai pregnantă a activității catalazei se înregistrează o dată cu mărirea dozelor și, în special, după administrarea celei de a 6-a doze, pentru ca după sistarea administrării, activitatea catalazică să revină la valori similare cu cele ale martorului.

Se poate concluziona, că atât extractul diluat de AS cât și soluția de acid ascorbic (1 %) administrate per os, au o acțiune similară, ambele conducând la o diminuare a activității catalazei spre deosebire de loturile tratate cu extract concentrat când activitatea catalazei suferă o creștere cu până la 161.7 %.

6.4.2.2.2. Influența unui extract diluat de *Allium sativum* asupra activității methemoglobin reductazei

Activitatea methemoglobin reductazei (MHbr) , la lotul tratat cu extract diluat , prezintă o evoluție asemănătoare cu a celui tratat cu extract concentrat , cu deosebirea că stimularea maximă a activității enzimei se situează la o valoare de 24.9 ± 0.98 UI cu 126.8 % mai mare față de valoarea martorului (tabelul 6.4.11 și graficul 6.4.12), pe când la lotul tratat cu extract concentrat , creșterea activității enzimei s-a obținut după 5 doze și se situa la valori cu 199 % mai mari față de valorile martorului (tabelul 6.4.2 și graficul 6.4.2).

Dinamica activității MHb reductazei este asemănătoare cu acelei de la lotul tratat cu extract concentrat.

Astfel, în urma administrării celei de a 2-a doze, efectul este imediat, activitatea reducându-se cu 7.4 % față de martor; o dată cu creșterea dozelor, se înregistrează o creștere a activității enzimei (după administrarea a trei doze), pentru ca după sistarea administrării, activitatea MHb reductazei, să se mențină la o valoare aproape constantă de 13.98 ± 0.53 U.I., cu aproape 40.8 % mai crescută față de lotul martor.

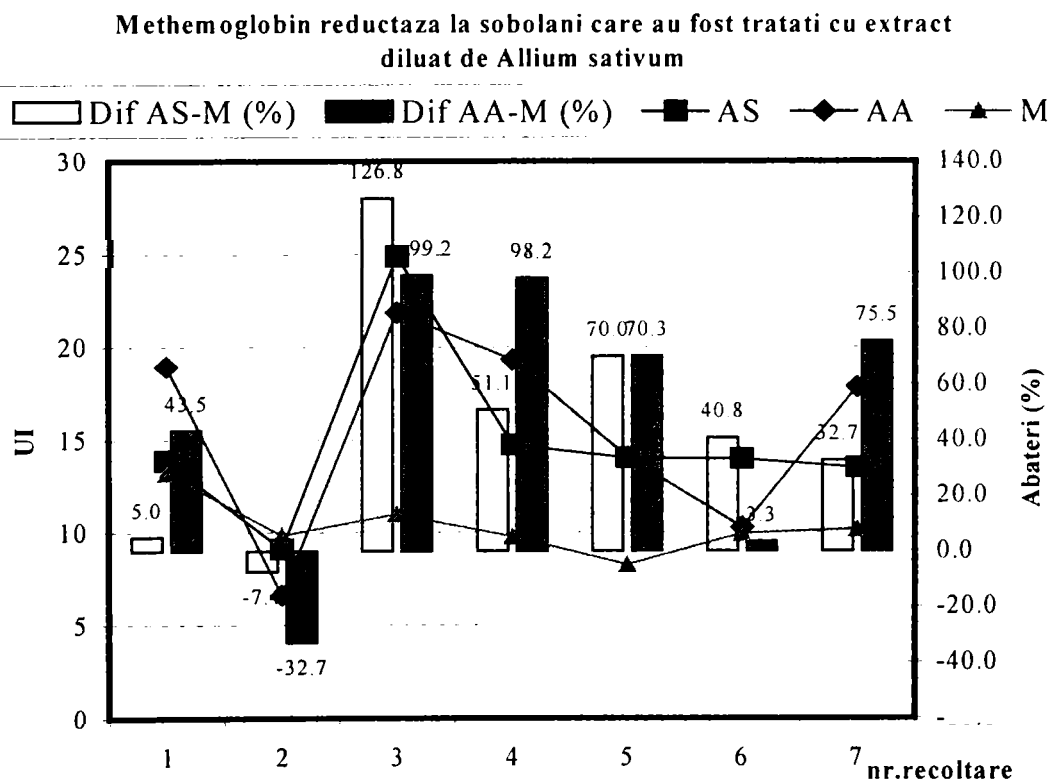
O dinamică asemănătoare se observă și la lotul tratat cu soluție de acid ascorbic.

Valorile medii activității methemoglobin reductazei, la șobolani tratați cu extract diluat de *Allium sativum*

Tabelul 6.4.11

zi recoltare	MHb reductaza %h		
	AS	AA	M
a-1a	13.89±0.11	18.99±1.56	13.23±1.54
a-2a	9.12±0.32	6.43±2.30	9.85±0.99
a-3a	24.9±0.98	21.87±1.06	10.98±2.34
a-4a	14.73±1.04	19.32±1.21	9.75±0.70
a-5a	14.04±2.11	14.07±0.96	8.26±0.43
Sist.+2	13.98±0.75	10.26±0.81	9.93±0.11
Sist.+7	13.5±0.83	17.85±1.26	10.17±1.87

Graficul 6.4.12



6.4.2.2.3 Influența unui extract diluat de *Allium sativum* asupra activității glutation reductazei

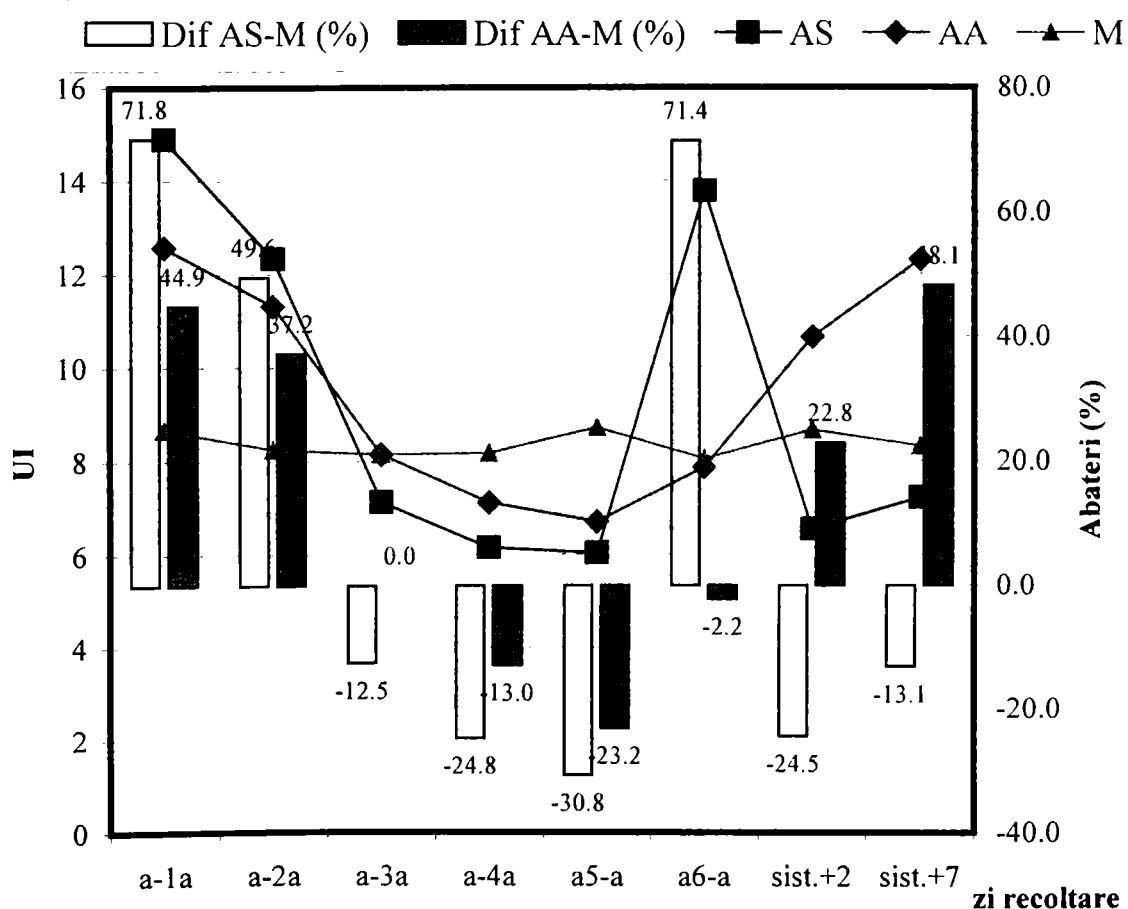
Spre deosebire de lotul tratat cu extract concentrat de AS, care prezintă o diminuare a activității enzimei cu 45.6 %, pe măsură ce crește numărul de doze, la **Valorile medii activității glutation reductazei, la șobolani tratați cu extract diluat de *Allium sativum***

Tabelul 6.4.12

zi recoltare	Glutation reductaza UI		
	AS	AA	M
a-1a	14.91±1.22	12.58±2.03	8.68±1.55
a-2a	12.34±0.98	11.32±1.11	8.25±1.04
a-3a	7.13±0.52	8.15±1.90	8.15±1.24
a-4a	6.15±0.14	7.12±0.97	8.18±0.98
a-5a	6.03±0.34	6.7±0.54	8.72±0.78
a-6a	13.78±0.99	7.86±0.66	8.04±0.24
Sist.+2	6.55±1.33	10.65±0.23	8.67±1.02
Sist.+7	7.22±2.11	12.31±0.34	8.31±.97

Grafic 6.4.13.

Glutation reductaza la șobolani care au fost tratați cu extract diluat de *Allium sativum*



lotul tratat cu extract diluat de *Allium sativum*, activitatea enzimei prezintă o evidentă stimulare după primele două doze (activitatea M_{Hb} reductazei și a catalazei scade), ca după a 3-a doză , activitatea glutathion reductazei să scadă la o valoare de 7.13 ± 0.52 UI cu 12.5 % mai scăzută față de a martorului. Activitatea glutathion reductazei se diminuează după a 4-a doză, iar prin sistarea administrării de extract, activitatea enzimei revine încet la valoarea martorului .

La lotul tratat cu soluție de acid ascorbic 1 % per os, activitatea glutathion reductazei prezintă o evoluție similară cu a lotului tratat cu extract diluat;

După sistarea administrării extractului de *allium sativum* și a soluției de acid ascorbic, ele prezintă o acțiune antagonistă: se constată că la lotul tratat cu extract diluat activitatea enzimei se diminuează cu până la 13.1 % , pe când la lotul tratat cu acid ascorbic, activitatea glutathion reductazei crește cu 48.1 % față de valoarea martorului, evoluție pe care deocamdată nu o putem explica.

Aceste observații duc la posibilitatea susținerii ipotezei că extractul de *Allium sativum* , prin componentele sale preia o parte din rolul antioxidant al echipamentului enzimatic al celulelor, similar cu acțiunea acidului ascorbic.

Se observă că în momentul sistării administrării substanțelor antioxidante , crește activitatea glutathion reductazei . Această creștere se dovedește mai pregnantă la administrarea de acid ascorbic 1% decât la cea a extractului de *Allium sativum*, ceea ce presupune menținerea unui efect prelungit al extractului spre deosebire de acidul ascorbic, a cărui acțiune încetează în momentul sistării administrării acestuia.

6.4.2.2.4. Influența unui extract diluat de *Allium sativum* asupra dinamicii proteinemiei

Din graficul 6.4.14 se observă că o creștere a numărului de doze conduce la o stimulare a sintezei proteinelor cu până la 10.6 % , pentru ca odată cu sistarea administrării de extract diluat , sinteza proteinelor să sufere o diminuare cu 4.3 %.

Soluția de acid ascorbic 1% are o acțiune antagonistă cu a extractului diluat. Proteinemia, la acest lot scade până la valori de 5.33 ± 0.78 , cu 13.5 % mai mici față de valoarea lotului martor, situându-se la valori mai scăzute chiar și față de valoarea minimă găsită în literatura de specialitate 5.6-7.6 g/100ml ser.(5)

Această diminuare a proteinemiei persistă până la sistarea administrării de acid ascorbic când proteinemia revine la valori similare cu ale lotului martor (7.12 ± 0.58 g/ml ser)

În concluzie se constată că extractul diluat de *Allium sativum* induce o creștere a sintezei proteice , pe măsura acumulării dozei, pentru ca la două zile de la sistarea administrării extractului proteinemia să sufere o stimulare a biosintezei cu aproape 11 %, iar după 1 săptămână de la sistarea administrării revină la valoarea inițială față de martor.

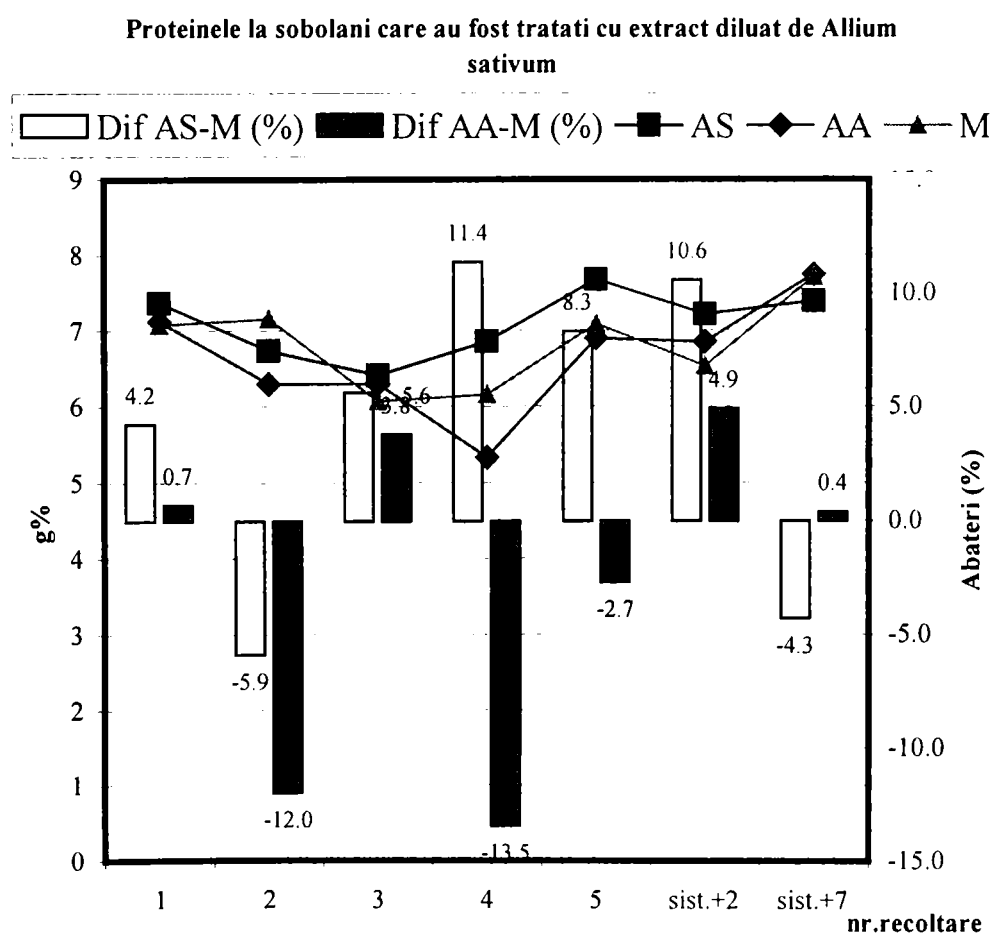
Spre deosebire de fenomenul observat anterior , acidul ascorbic are în general un efect de diminuare a proteinemiei , pentru ca după 7 zile de la sistarea administrării , proteinemia să fie cu 4 % mai crescută față de valorile medii ale lotului martor.

Valorile proteinemiei, la șobolani tratați cu extract diluat de *Allium sativum*

Tabelul 6.4.13

Ziua recoltare	Proteine g%		
	AS	AA	M
a-1a	7.38±0.78	7.13±0.76	7.08±0.76
a-2a	6.74±0.65	6.3±0.83	7.16±0.90
a-3a	6.41±1.02	6.3±0.89	6.07±0.60
a-4a	6.86±0.63	5.33±0.46	6.16±0.72
a-5a	7.68±1.23	6.9±0.53	7.09±0.71
Sist.+2	7.22±0.98	6.85±0.66	6.53±0.79
Sist.+7	7.39±0.88	7.75±0.82	7.72±0.1.20

Graficul.6.4.14.



6.4.2.2.5. Influența unui extract diluat de *Allium sativum* asupra dinamicii hemoglobinemiei

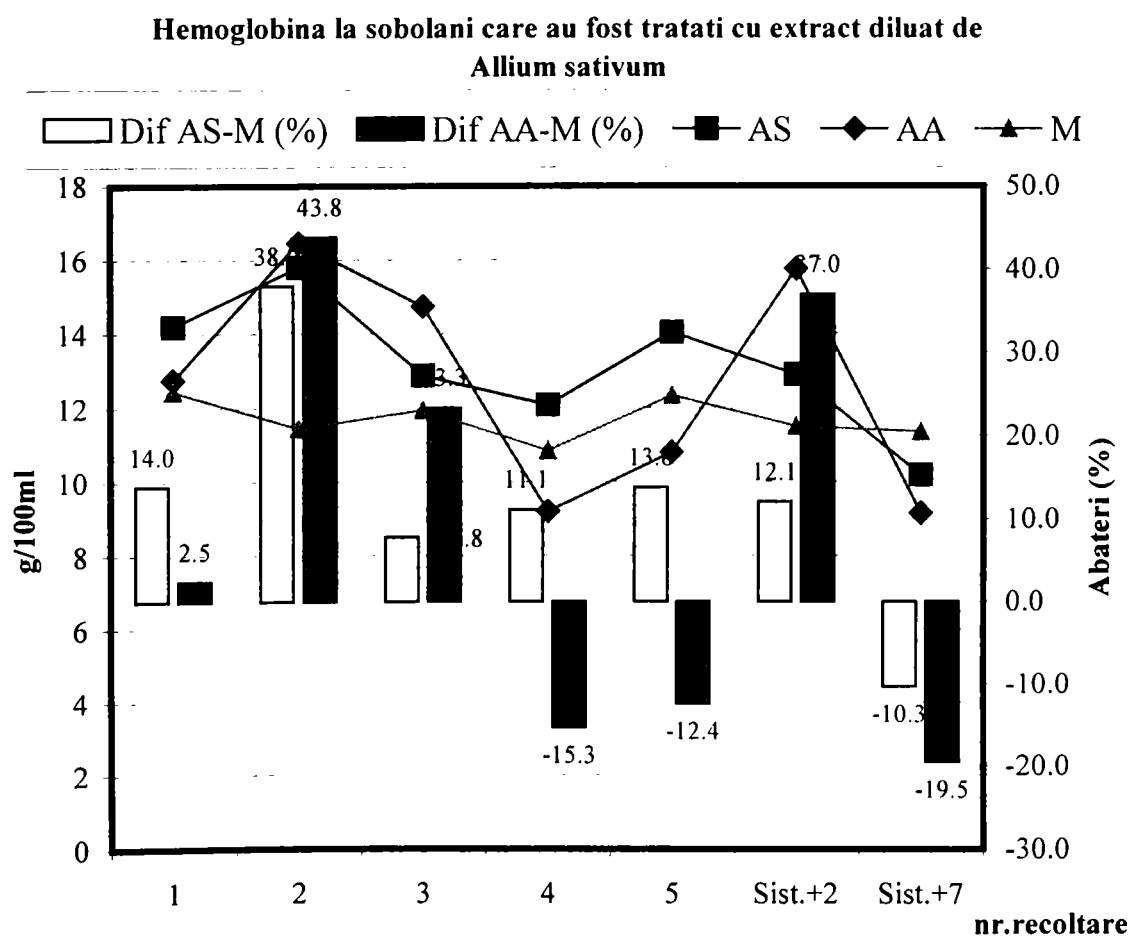
În ceea ce privește dinamica hemoglobinemiei la lotul tratat cu extract diluat de AS, aceasta prezintă o stimulare cu 14 % , după prima doză, spre deosebire de efectul extractului concentrat care induce o diminuare cu până la 38.1 % a hemoglobinemiei (tabelul 6.4.14. și graficul 6.4.15).

Valorile hemoglobinemiei, la șobolani tratați cu extract diluat de *Allium sativum*

Tabelul 6.4.14

Nr.recoltare	Hemoglobina g%		
	AS	AA	M
1	14.19±1.23	12.76±0.77	12.45±0.78
2	15.8±0.67	16.47±0.46	11.45±0.86
3	12.88±0.43	14.74±0.88	11.95±0.49
4	12.07±0.98	9.2±0.51	10.86±0.38
5	14.04±1.01	10.81±0.49	12.34±1.02
Sist.+2	12.89±0.64	15.75±0.52	11.5±0.97
Sist.+7	10.19±0.22	9.15±0.55	11.36±0.31

Graficul 6.4.15



După cea de-a doua doză se înregistrează o creștere a hemoglobinemiei cu 38 % față de martor, pentru ca la acumularea următoarelor doze , hemoglobinemia să prezinte o dinamică ascendentă cu până la 12.8 % în medie. În urma sistării administrării de extract diluat de AS, hemoglobinemia scade în timp, cu 10.3 % față de lotul martor.

Dinamica Hb la lotul tratat cu AA prezintă, după primele doze, o evoluție similară cu a lotului tratat cu extract de *Allium sativum*, ca după a 4-a doză administrată, valorile Hb să scadă la valori de 9.2 ± 0.51 g%, cu 15.3 % mai scăzute față de lotul martor; diminuarea se menține în continuare în paralel cu creșterea dozei totale administrate, pentru ca după sistarea administrării Hb, să se mențină la valori mai scăzute decât ale martorului.

6.4.2.2.6. Influența unui extract diluat de *Allium sativum* asupra dinamicii methemoglobinemiei

O dinamică ce se corelează cu evoluția hemoglobinemiei se constată atât la lotul tratat cu extract diluat de *Allium sativum* cât și la lotul tratat cu soluție de acid ascorbic.

Spre deosebire de lotul tratat cu extract concentrat de AS , la care valoarea MHb înregistrează , după primele 3 doze o creștere cu aproape 103.1% față de valoarea martorului, la lotul tratat cu AS diluat methemoglobinemia scade, după prima doză de extract cu 30.5 %, ceea ce corespunde unei valori de 0.0216 ± 0.0040 g % Hb, respectiv unei creșteri cu 14 % a hemoglobinemiei. După cea de-a 2-a doză MHb crește cu 59.4 % față de martor, urmând ca după încă două doze, MHb să ajungă la o valoare de 0.0164 ± 0.031 cu 57 % mai redusă decât cea a martorului (tabelul 6.4.15 și graficul 6.4.16), dar se situează la valori apropiate de ale lotului tratat cu extract concentrat de AS, la cea de-a 7-a recoltare.

O scădere a hemoglobinemiei după sistarea administrării de extract diluat de AS, se corelează cu o creștere a methemoglobinemiei cu 19.4%, pentru ca după 7 zile de la sistarea administrării, methemoglobinemia să prezinte o valoare de 0.0235 ± 0.00115 g % Hb , cu 38.8% mai scăzută față de martor ; o valoare apropiată se înregistrează și la lotul tratat cu extract concentrat la 7 zile după sistarea administrării.

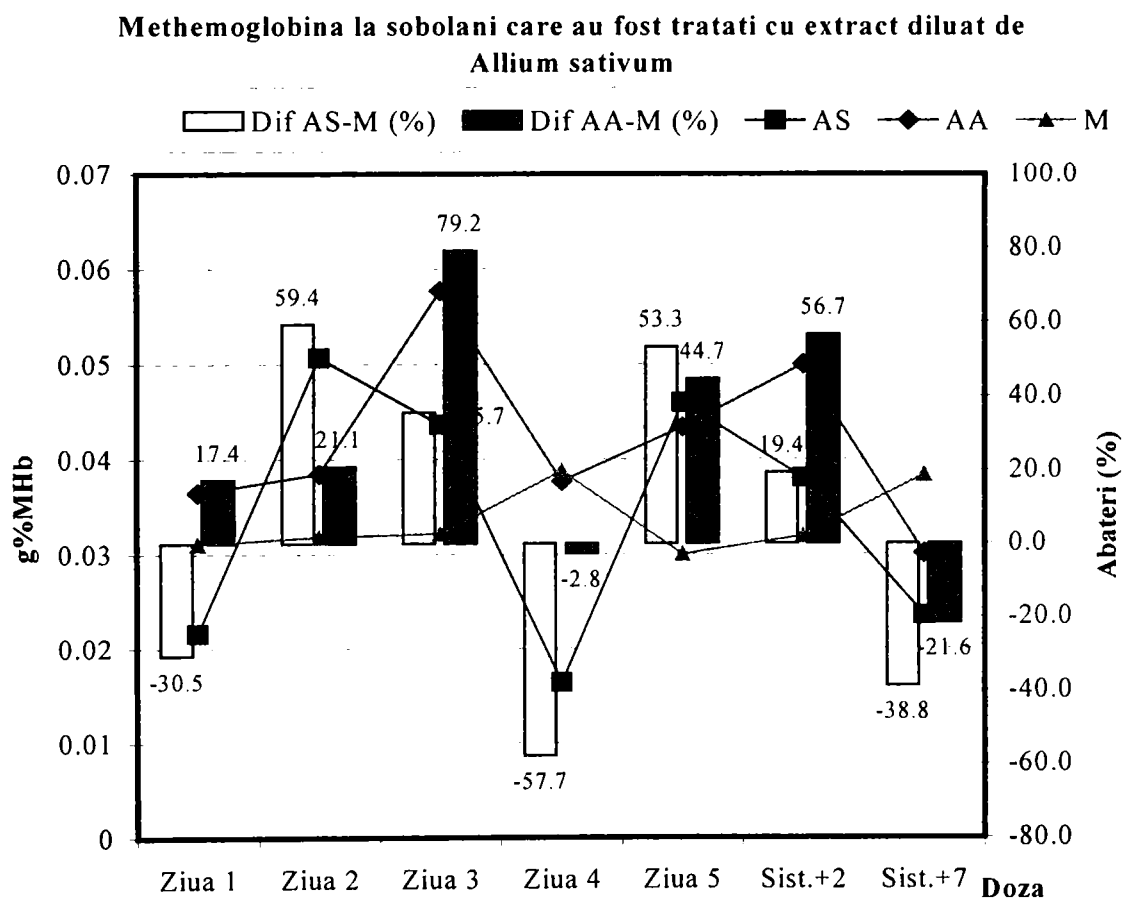
Se remarcă un efect drastic de creștere a methemoglobinemiei la lotul tratat cu extract concentrat de AS, spre deosebire de lotul tratat cu extract diluat, ceea ce confirmă presupunerea că extractul concentrat acționează ca un toxic, în timp ce extractul diluat are un efect antioxidant comparabil cu al soluției de acid ascorbic.

**Influența unui extract diluat de *Allium sativum* asupra dinamicii
methemoglobinemiei, la șobolani**

Tabelul 6.4.15.

Nr.recoltare	Methemoglobina g%		
	AS	AA	M
1	0.0216±0.0040	0.0365±0.0065	0.0311±0.0054
2	0.0507±0.0030	0.0385±0.0021	0.0318±0.0021
3	0.0437±0.0023	0.0577±0.0009	0.0322±0.007
4	0.0164±0.0031	0.0377±0.004	0.0388±0.0032
5	0.046±0.0033	0.0434±0.0005	0.03±0.005
Sist.+2	0.0381±0.001	0.05±0.002	0.0319±0.0013
Sist.+7	0.0235±0.0015	0.0301±0.0032	0.0384±0.0024

Graficul 6.4.16



6.4.2.2.7. Influența unui extract diluat de *Allium sativum* asupra activității transaminazelor serice (ALAT , ASAT)

Rezultatele determinărilor sunt prezentate în tabelele 6.4.16 ,6.4.17 și graficele 6.4.17 și 6.4.18

Din graficul 6.4.17 se observă că în urma administrării primei doze de extract diluat de AS activitatea alanin aminotransferazei prezintă o valoare medie de 61.66 ± 1.36 UI ceea ce înseamnă o creștere cu 99.4 % față de valoarea martorului care se situează la valori similare cu cele din literatura de specialitate (5).

Un comportament asemănător manifestă și soluția de acid ascorbic, creșterea activității transaminazei serice găsindu-se la o valoare cu 105.5 % mai ridicată față de martor.

Pe măsura creșterii numărului de doze de extract diluat de AS se observă o reducere a activității ALAT-ului, astfel că după 4 doze valoare activității enzimei este cu 33.7 % mai ridicată, după 5 doze se situează la o valoare de 45.5 ± 1.23 , cu 9.8 % mai mare față de valoarea martorului, pe când la 2 zile , respectiv la 5 zile de la sistarea administrării activitatea enzimei să revină la valori apropiate de cele ale martorului.

Din graficul 6.4.18 se observă o scădere a activității ASAT cu 16.1 % față de lotul martor , pentru ca odată cu creșterea numărului de doze să se înregistreze o mărire a activității enzimei. Astfel, după a 5-a doză , activitatea aspartat amino transferazei înregistrează o valoare de 78.73 ± 2.05 UI , cu 24.4 % mai mare față da martor, care prezintă o valoare medie de 65.48 ± 0.95 UI care se încadrează în valorile limită regăsite în literatura de specialitate.

La sistarea administrării, efectul extractului diluat de AS se menține crescut, astfel că se înregistrează o valoare a activității ASAT de 96.54 ± 2.15 , cu 50.2% mai crescută față de a martorului.

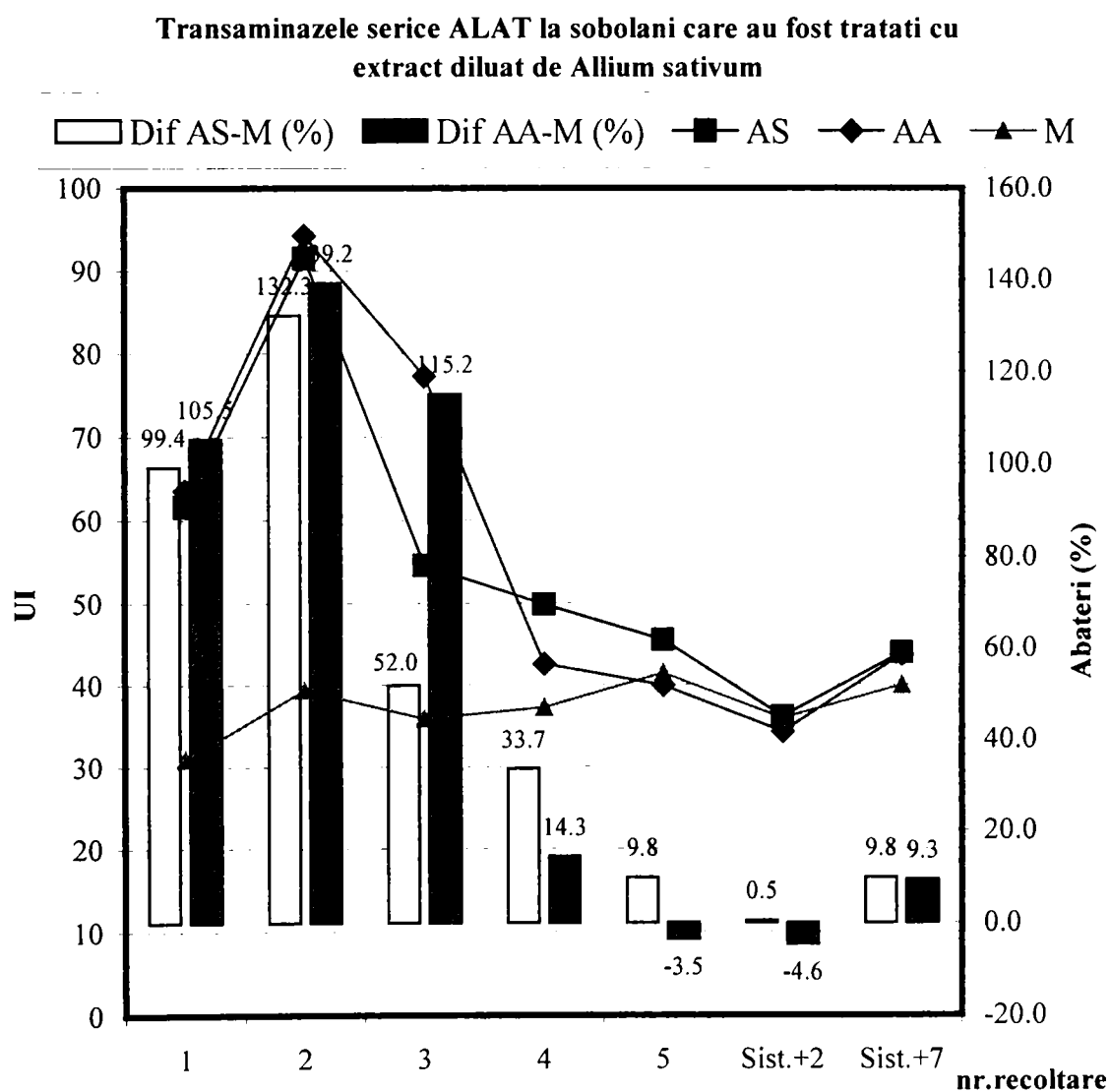
La lotul tratat cu acid ascorbic, dinamica activității enzimatică este aproape similară, înregistrându-se totuși valori ceva mai scăzute (88.11 ± 2.42 UI), pentru ca la 7 zile de la sistarea administrării , valorile celor două loturi să fie cu aproximativ 30.4 % mai ridicate față de valoarea martorului.

Influența unui extract diluat de *Allium sativum* asupra activității alanin amino transferazei serice (ALAT), la șobolani

Tabelul 6.4.16

Nr.recoltare	ALAT (UI)		
	AS	AA	M
1	61.66±1.36	63.53±1.45	30.92±0.96
2	91.52±1.55	94.26±2.12	39.4±1.02
3	54.58±2.02	77.25±1.97	35.9±1.32
4	49.84±1.98	42.62±1.56	37.29±1.43
5	45.5±1.23	39.96±1.24	41.43±1.78
Sist.+2	36.08±1.34	34.24±1.88	35.9±1.35
Sist.+7	43.88±1.44	43.65±0.91	39.95±1.22

Graficul 6.4.17

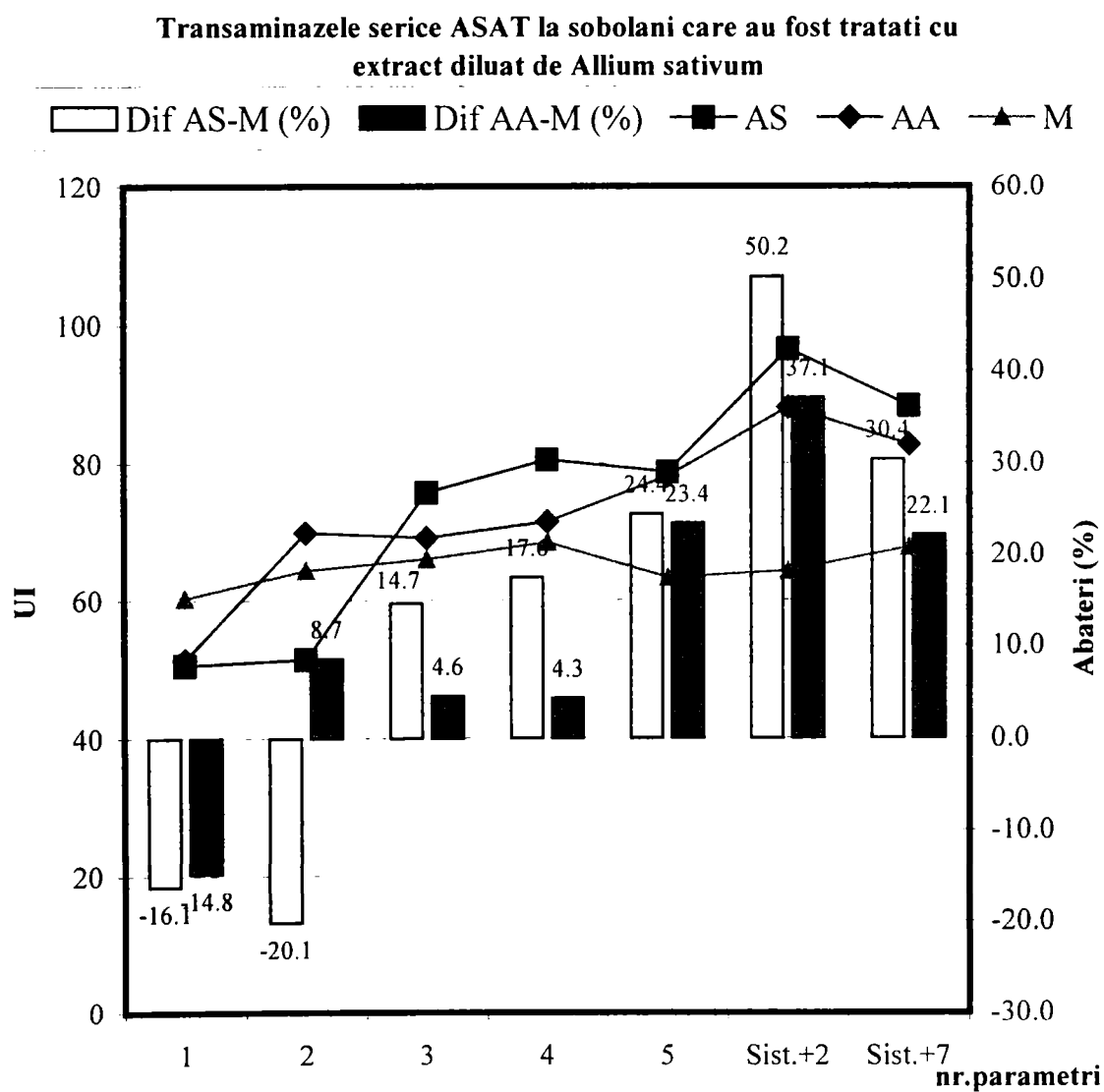


**Influența unui extract diluat de *Allium sativum* asupra activității aspartat
aminotransferazei serice (ASAT), la șobolani**

Tabelul 6.4.17

Nr.recoltare	ASAT UI		
	AS	AA	M
1	50.59±1.03	51.42±1.31	60.33±1.78
2	51.43±1.52	69.95±1.30	64.38±1.30
3	75.78±1.87	69.11±1.12	66.07±0.98
4	80.5±1.32	71.44±2.32	68.48±1.13
5	78.73±2.05	78.09±2.15	63.28±1.41
Sist.+2	96.54±2.15	88.11±2.42	64.26±1.17
Sist.+7	88.29±1.75	82.67±2.72	67.7±2.05

Graficul 6.4.18



În concluzie, extractul diluat potențează activitatea enzimei ALAT la primele doze (cu până la 132.3 % față de martor- graficul 6.4.17), pentru ca după acumularea acestuia , să aibă un efect de diminuare a activității ALAT-ului până la valori apropiate de ale lotului martor, spre deosebire de extractul concentrat care duce la creșteri mult mai mari ale activității ALAT-ului față de lotul martor , chiar și după sistarea administrării acestuia (150.3% - graficul 6.4.9) ; în ceea ce privește afectarea enzimei ASAT în urma administrării de extract diluat, aceasta înregistrează valori ușor mai crescute după primele doze administrate (17.6% - graficul 6.4.17) pentru ca odată cu creșterea dozelor activitatea enzimei să crească cu până la 50.2% față de valorile martorului. Efectul se diminuează , totuși și după șapte zile de la sistarea administrării valorile activității ASAT înregistrează creșteri de până la 30.4%. La administrarea extractului concentrat se observă o comportare similară a enzimei ASAT, cu deosebirea că activitatea acesteia crește cu 41.7% față de martor(graficul 6.4.10). Un comportament asemănător cu administrarea extractului diluat se înregistrează și la lotul cărui i s-a administrat acid ascorbic.

6.4.2.3. Interpretarea statistică a datelor obținute

S-au efectuat interpretările statistice ale datelor obținute pentru activitățile enzimatică atât sub influența extractului diluat de *Allium sativum* cât și a extractului concentrat. Datorită numărului limitat al determinărilor biochimice efectuate, rezultatele obținute sunt orientative.

S-a determinat coeficientul de corelație între doi parametri, ecuația de regresie, precum și parametrul “ t ” (parametrul Student, în vederea stabilirii dependenței între două fenomene, a corelației, respectiv a legăturii reciproce dintre valorile mărimilor obținute anterior.

Rezultatele obținute în ceea ce privește identificarea coeficientului de corelație și a ecuației ce definește acest coeficient, sunt redate în tabelul 6.4.18

Determinarea coeficientului de corelație și ecuația curbei de regresie

Tabelul 6.4.18

Parametrii urmăriți	Coeficient de corelație (r)	Ecuația de regresie	Corelație
Catalază:doză ASd	0.90264	Ec. polinomială $y=a+bx+cx^2+dx^3$ Unde $a=23.187$, $b=-0.345$, $c=0.0277$, $d=0.000459$	Pozitivă strânsă
Catalază:doză ASc	0.98657	Ec. polinomială $y=a+bx+cx^2+dx^3$ Unde $a=72.1315$, $b=-3.8395$, $c=0.17884$, $d=-0.00243$	Pozitivă strânsă
MHbred:doză ASd	0.24257	Ec. polinomială $y=a+bx+cx^2+dx^3$ Unde $a=20.23$, $b=-1.3615$, $c=0.07050$, $d=-0.0009243$	Pozitivă slabă
Glured:doză ASd	0.91459	Ec. polinomială $y=a+bx+cx^2+dx^3$ Unde $a=36.264$, $b=-3.065$, $c=0.9915$, $d=-0.00093$	Pozitivă strânsă
Glured:doză ASc	0.288685	Ec. polinomială $y=a+bx+cx^2+dx^3$ Unde $a=1.9245$, $b=0.4437$, $c=-0.0171$, $d=0.0001854$	Pozitivă slabă
Catalază:MHb ASd	0.13354	Ec. grd. I $y=a+bx$ Unde $a=18.4624$, $b=0.2124$	Pozitivă slabă
Catalază:MHb ASc	0.57927	Ec. polinomială $y=a+bx+cx^2+dx^3$ Unde $a=-12.5362$, $b=19.1679$, $c=-1.6797$, $d=0.04094$	Pozitivă medie
Catalază:Glu ASd	0.61952	Ec. polinomială $y=a+bx+cx^2+dx^3$ Unde $a=-7258.9$, $b=1492.42$, $c=-$ 101.52 , $d=2.290$	Pozitivă medie
Catalază:Glu ASc	0.15620	Ec. polinomială $y=a+bx+cx^2+dx^3$ Unde $a=407.97$, $b=-223.82$, $c=44.4949$, $d=-2.853$	Pozitivă slabă
MHb: Glu ASc	0.20708	Ec. polinomială $y=a+bx+cx^2+dx^3$ Unde $a=343.46$, $b=-191.32$, $c=36.7419$, $d=-2.3288$	Pozitivă slabă

ASd= extract diluat de Allium sativum, ASc= extract concentrat de Allium sativum

Determinarea parametrului "t" și a coeficientului de siguranță

Tabelul 6.4.19

Nr. crt.	Parametrul	Nr. grade libertate	Parametrul "t" obținut	Prag de semnificație	Coef. Siguranță %	Parametrul "t" literatură 0	Rezultat
1.	Catalază (As diluat)	40	3.20	0.01	99	2.71	Asigurat statistic
2.	MHbred. (As diluat)	40	2.66	0.02	98	2.42	Asigurat statistic
3.	Glured. (As diluat)	40	2.33	0.05	95	2.02	Asigurat statistic
4.	Hb (As diluat)	40	2.78	0.01	99	2.71	Asigurat statistic
5.	MHb (As diluat)	40	1.23	0.10	90	1.68	Neasigurat statistic
6.	Catalază (As conc.)	40	2.381	0.05	95	2.02	Asigurat statistic
7.	MHbred. (As conc.)	40	2.84	0.01	99	2.71	Asigurat statistic
8.	Glured. (As conc.)	40	4.71	0.01	99	2.71	Asigurat statistic
9.	Hb (As conc.)	40	2.44	0.02	98	2.42	Asigurat statistic
10.	MHb (As conc.)	40	1.65	0.10	90	1.68	Neasigurat statistic

Concluzii:

- Extractul concentrat (2.34 μ moli % tiosulfinați , 1.12 μ moli % alicină) afectează în mod evident echipamentul de oxidoreducere a celulei sanguine cât și funcțiile ficatului, având următoarele efecte:
 - scăderea hemoglobinemiei , în medie , cu 38.1% față de valoarea matorului
 - creșterea methemoglobinemiei după primele doze cu 103.1 % față de limitele normale evidențiate în literatura de specialitate

- menținerea efectului extractului chiar și după șapte zile de la sistarea administrării acestuia
- creșterea activității catalazei cu aproape 100 % , după administrarea a cinci doze, pentru ca după sistarea administrării , activitatea catalazei să se reducă chiar sub valoarea normală cu 25 %
- creșterea activității methemoglobin reductazei, după primele cinci doze, cu aproape 97.3 % , urmată de o scădere a activității enzimei
- creșterea activității catalazei și a methemoglobinreductazei conduce deasemenea la o reducere a activității glutathion reductazei cu până la 48.7% , față de activitatea martorului.
- afectarea funcției normale a ficatului prin creșterea activității alanin amino transferaza (ALAT) , raportul de Rittis (ALAT/ASAT) înregistrând o valoare de 1.1 față de valoarea normală de 1.3.
- scăderea proteinemiei odată cu creșterea numărului de doze , cu până la 17.9 %
- scăderea sideremiei cu până la 48.7% față de valoarea martorului
- efect antagonist față de al acidului ascorbic , față de care s-au efectuat toate determinările
- toate aceste efecte negative atât la nivelul sintezei de proteine , respectiv a hemoglobinei se repercutează asupra activității normale a oxidoreductazelor și conduc totodată la perturbarea funcției normale a unor organe cheie: ficat , splină și rinichi, după cum se va prezenta în subcapitolul 6.4.3.
- extractul concentrat acționează ca un toxic asupra organismului animal

Spre deosebire de activitatea evident nocivă a extractului concentrat , extractul diluat (0.56 μ moli % tiosulfinați , 0.12 μ moli % alicină) are un efect total antagonist ceea ce se observă atât din valorile activității oxidoreductazelor cât și a sintezei de hemoglobină

Se constată următoarele:

- creșterea hemoglobinemiei la o valoare medie de 13.8 g% Hb, cu 12 % mai mare decât a martorului; efectul este comparabil ce cel al acidului ascorbic, antioxidant și stimulator cunoscut al sintezei de hemoglobină
- scăderea methemoglobinemiei după prima doză administrată, efect ce se menține și la șapte zile după sistarea administrării (efect " retard ")
- scăderea activității catalazei similară cu cea produsă de administrarea acidului ascorbic

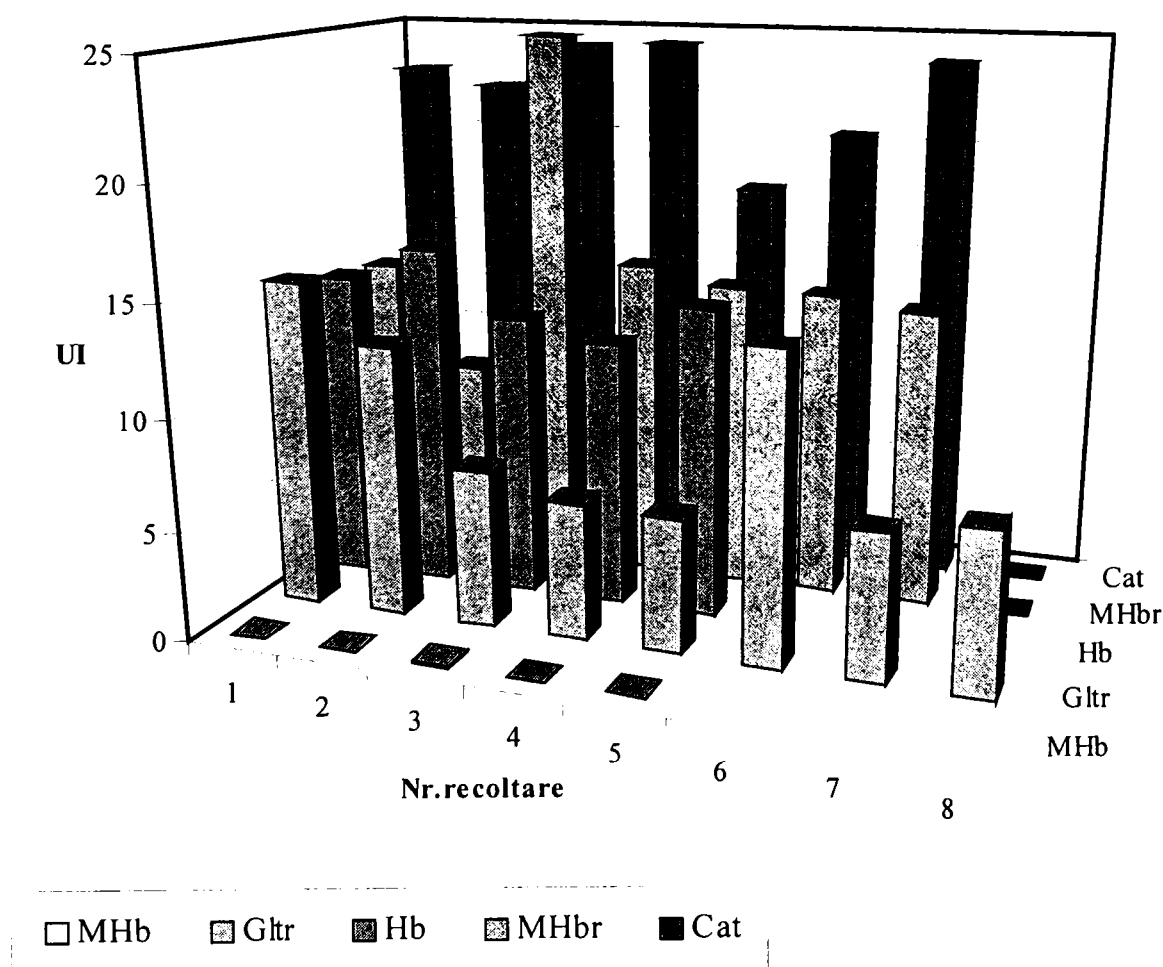
- stimularea activității methemoglobin reductazei cu până la 126.8%; această stimulare a activității methemoglobin reductazei se manifestă și după 7 zile de la sistarea administrării spre deosebire de acidul ascorbic a cărui efect se resimte numai până în momentul administrării, neavând o prelungire în timp a acestui efect și după sistarea administrării
- stimularea activității glutatation reductazei, după primele două doze administrate , ca odată cu sistarea administrării, activitatea glutatation reductazei să scadă cu până la 13.1 %; activitatea glutatation reductazei ,după administrarea a cinci doze de extract , este similară cu a acidului ascorbic
- extractul diluat de Allium sativum crește capacitatea sistemelor reducătoare eritrocitare prin creșterea activității methemoglobin reductazei, a glutatation reductazei pe de o parte , urmată de scăderea methemoglobinemiei, respectiv creșterea hemoglobinemiei.
- valorile crescute ale methemoglobin reductazei și glutatation reductazei pot fi markeri indirecți de activare a metabolismului eritrocitar.
- remanierele țesutului hepatic sunt activate și în consecință nivelul seric al transaminazelor ALAT și ASAT este crescut
- se înregistrează o stimulare a sintezei de proteine totale cu până la 10.6 % față de martor, probabil prin activarea sintezei extrahepatice de proteine.
- se remarcă o corelație strânsă atât între activitatea catalazică și dozele de Allium sativum diluat cât și între activitatea catalazică și dozele de Allium sativum concentrat
- o corelație slabă și medie se remarcă între activitatea methemoglobinreductazei și dozele de extracte diluate respectiv concentrate de Allium sativum
- o corelație strânsă se remarcă și între activitatea glutatation reductazei și dozele de Allium sativum diluat, pe când față de Allium sativum concentrat corelația este slabă
- aceeași corelație slabă și medie se remarcă și între activitățile celor trei enzime
- activitățile catalazei, a methemoglobin reductazei , a glutatation reductazei și valorile hemoglobinei la loturile experimentale, față de loturile martor, sunt asigurate statistic , atât la cele tratate cu extract diluat cât și la cele tratate cu extract concentrat de Allium sativum

Efectele benefice ale administrării extractului diluat sunt similare cu cele ale acidului ascorbic conducând la stimularea întregului echipament oxidoreducător al celulelor prezentând totodată avantajul unui efect prelungit, chiar și după o săptămână de la sistarea administrării acestuia spre deosebire de acidul ascorbic care își manifestă acest efect numai pe perioada administrării.

Rezultatele activității antioxidante ale extractului diluat de *Allium sativum* sunt prezentate global în graficul 6.4.19.

Graficul 6.4.19

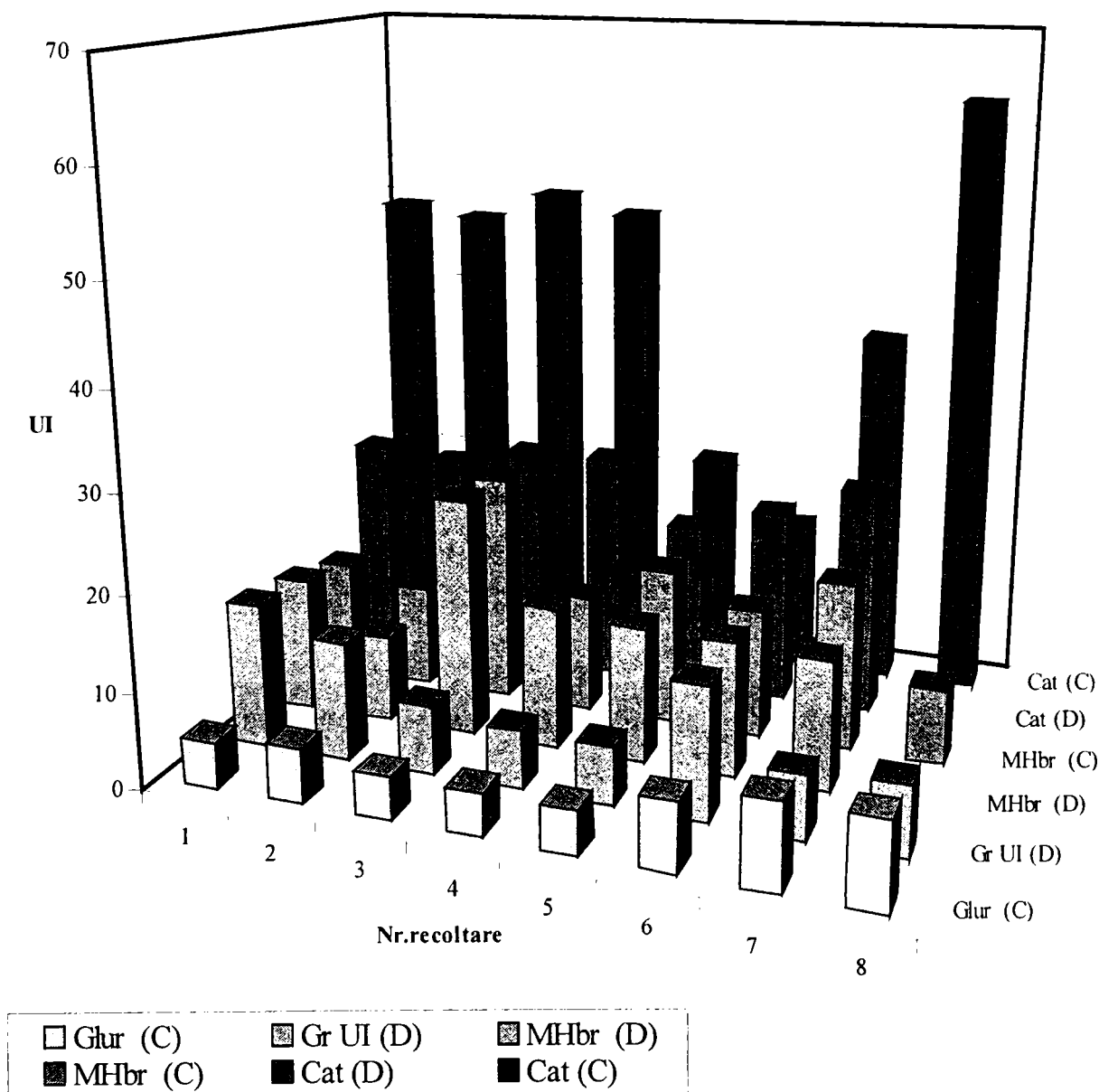
Influența extractului diluat asupra răspunsului antioxidant al unor parametrii sanguini



Efectul celor două tipuri de extracte asupra enzimelor oxidoreducătoare studiate sunt redată în graficul 6.4.20

Graficul 6.4.20

Efectul comparativ al extractului concentrat și diluat asupra activității



enzimelor oxidoreducătoare

C = extract concentrat de *Allium sativum*

D = extract diluat de *Allium sativum*

6.4.3. Modificările survenite la nivelul unor organe de șobolan sub influența extractului concentrat de *Allium sativum*

Ținând cont de rezultatele obținute asupra unor parametrii biochimici sanguini și a asupra unor enzime oxidoreducătoare, care au fost prezentate în subcapitolele 6.4.1 și respectiv 6.4.2, studiul întreprins și-a propus observarea eventualelor modificări la nivelul unor organe, la șobolani, cărora li s-a administrat extract concentrat de *Allium sativum*.

În continuare vor fi prezentate câteva considerații teoretice asupra organelor studiate: splina, ficatul și rinichii. Acestea au fost prelevate imediat după sacrificare, de la același lot de șobolani cărora li s-au efectuat și determinările enzimatică și a parametrilor biochimici sanguini.

Splina este un organ hematopoetic în care are loc diferențierea finală a reticulocitelor, trombocitelor, limfocitelor T și B și a monocitelor. Splina dirijează și reglează circulația eritrocitelor, distrugând sau modificând globulele roșii imperfecte. De asemenea, îndepărtează din sânge toate elementele figurate deteriorate sau îmbătrânite. Splina preia din sânge monocite, facilitând transformarea lor în macrofage, precum și limfocite B și T pe care le stochează în diferite compartimente favorizând maturarea lor și făcându-le apte să interacționeze cu macrofagele și antigenii, participând astfel la răspunsul imun (295).

Splina reprezintă un important rezervor de sânge, eliberând rapid în circulație eritrocite, granulocite atunci când este nevoie.

Structura histologică a splinei cuprinde următoarele componente: capsulă conjunctivă din care se desprind trabeculi în profunzimea organului, pulpa splenică (formată în mare parte din eritrocite și fiind componenta majoră a splinei), pulpa albă, care conține grămezi de limfocite; este alcătuită din limfonoduli splenici, ce conțin în special limfocitele B, macrofage și limfocite T precum și din manșoane limfatice periarteriale. Limfocitele B și macrofagele, se găsesc în zona marginală a pulpei roșii și sunt primele care stabilesc contactul cu antigenii.

Ficatul are rolul de a sintetiza numeroase substanțe necesare integrității structurale și funcționale a celulelor și țesuturilor. Ficatul supune mulți compuși biologici, respectiv substanțele toxice unui lanț de transformări prin care li se reduce sau li se anihilează activitatea sau toxicitatea, rezultând în general substanțe inofensive care vor fi eliminate din organism. Este posibil de asemenea, ca în urma proceselor de transformare a unor medicamente acestea să treacă în produși toxici pentru organism.

Ficatul este format în principal din două componente de bază: hepatocitele și celulele Kupffer. Acestea din urmă au rolul de a complecta activitatea de detoxifiere și de îndepărtare a substanțelor nocive realizată de hepatocite.

În cazul acțiunii prelungite a unor factori nocivi care afectează structura și funcțiile ficatului, acesta suferă un fenomen de degenerescență fibroconjunctivă, cunoscut sub numele de ciroză. (295)

Rinichii sunt organe ce au un rol deosebit în filtrarea sângelui și în menținerea homeostaziei organismului, asigurând echilibrul acido-bazic și electrolitic necesar activității normale a celulelor. Un alt rol îl constituie secreția de renină, funcționând în acest fel ca un organ endocrin, având un important rol în reglarea presiunii osmotice a sângelui precum și de secreție a factorului eritropoietic (eritopoetina). Anumiți constituenți celulari renali au rol activ în metabolismul vitaminei D și a calciului.

Rinichii sunt alcătuiți din: zona corticală, zona medulară, corpusculi renali, nefroni (alcătuiți la rândul lor din glomerul vascular, capsula Bowman – care se presupune a avea rol fagocitar, îndepărtând particulele străine din corpusculul renal și tubi contorți) și canale colectoare.

Unitatea morfofuncțională a rinichiului este nefronul.

6.4.3.1. Material și metodă:

Șobolani de linie Wistar, pentru a constitui un lot cât mai uniform, au fost aleși de aceeași vârstă cu o greutate corporală aproape constantă cuprinsă între 250-320g. Hrana și condițiile de întreținere au fost aceleași pe tot parcursul experimentului.

Au fost formate două loturi: unul martor format din 45 de indivizi, cărora li s-au administrat 0.5 ml apă distilată (per os)/individ și un lot experimental constituit tot din 45 de indivizi, cărora li s-au administrat per os 0.5 ml extract concentrat/individ (1.58 mg tiosulfinați/ml extract) timp de 16 zile.

Sacrificările au fost efectuate la 8, 14 și respectiv 16 zile de la începutul administrării extractului, atât din lotul martor cât și din lotul experimental (câte 15 indivizi / lot / sacrificare)

După sacrificare au fost prelevate și studiate următoarele organe: splina , ficatul și rinichii ; acelorași loturi de șobolani li s-au efectuat și determinările enzimaticice și a parametrilor biochimici sanguini (6.4.1, 6.4.2).

Preparatele histologice au fost obținute prin realizarea următoarei succesiuni de operații: recoltare, fixare, spălare, incluzionare, secționare, colorare și montare.

Examenle histologice au fost efectuate pe preparate histologice conservate prin fixare.

Pentru a evita alterările ce pot apărea post-mortem, organele au fost prelevate imediat după sacrificare, au fost cântărite și au fost introduse în borcane cu dop rodat , în care s-a introdus alcool etilic 80 % , pentru fixare. În această soluție de fixare s-au menținut timp de 10 zile , după care a urmat operația de spălare cu apă distilată pentru a îndepărta excesul de fixator.

După spălare s-a trecut la incluzionarea preparatelor în parafină. Înainte de incluzionare , piesele s-au clarificat prin tratarea cu toluen care înlătură totodată și alcoolul din fragmentele tisulare.

Îmbibarea pieselor cu parafină s-a realizat în termostat , la temperatura de 56 °C, în cristalizoare mici. Aceasta s-a realizat prin imersarea repetată a pieselor, în trei băi de parafină, fiecare cu o durată de 1 oră. Din ultima baie, fragmentele tisulare sunt trecute în tipare de metal, așezate pe o placă de sticlă. Peste piese s-a turnat parafină topită și s-au lăsat la temperatura camerei pentru solidificare.

Secționarea preparatelor s-a realizat cu ajutorul microtomului , realizându-se secțiuni de 4-8 μ .

Acestea au fost lipite pe o lamă de sticlă , pe care , în prealabil s-a întins un strat subțire de albumină Mayer . După colorarea cu reactivul May-Grunwald-Giemsa(MGM), s-a realizat colorarea diferită a preparatelor.

Ultima operație a fost montarea preparatelor ; această operație s-a executat prin aplicarea a 2 picături de ulei de cedru peste secțiunea colorată care apoi s-a acoperit cu o lamelă. După 24 de ore mediul s-a solidificat permițând examinarea ulterioară a

preparatului la microscop. Montarea asigură o conservare vreme îndelungată a preparatelor.

Preparatele au fost examinate cu ajutorul unui microscop tip Karl-Zeiss Jena, prevăzut cu un aparat de fotografiat.

6.4.3.2. Rezultate și discuții:

În urma administrării de extract concentrat de *Allium sativum*, timp de 16 zile, la șobolani, a prelevării de organe și a obținerii de preparate histologice s-au constatat următoarele:

După 8 zile de administrare splina prezintă o proliferare limfocitară atât în limfonodulii splenici cât și în cordoanele celulare perivasculare ale pulpei roșii. Limfonodulii și tecile limfoide perivasculare apar mărite în volum , de multe ori pierzându-și conturul.

Se constată o reacție limfocitară exacerbată.

Odată cu creșterea dozei de extract concentrat , după 14 doze, se constată o proliferare masivă atât în limfonoduli cât și în tecile perifoliculare.

În cordoanele celulare perivasculare din pulpa roșie este semnalat un număr sporit de macrofage și de limfoplasmocite.

Se semnalează , de asemenea apariția corpiilor Heinz , în număr de 4-5 / secțiune;

Aceste observații s-ar putea explica ca o intensificare a răspunsului imun imediat (apariția de limfocite proactice).

După a 16-a doză apar din nou un număr extrem de mare de limfoplasmocite activate și macrofage , situate mai ales în cordoanele celulare din pulpa roșie și se constată deasemenea apariția unui număr mai mare de corpi Heinz (în medie un număr de 3 /0.031 mm² –aria unui câmp microscopic). Se observă și o hipertrofie a celulelor reticulate adică o micșorare a lacunelor sistemului reticular al splinei și probabil o intensificare a procesului de eritroclazie, ceea ce are drept consecință formarea de corpi Heinz.

Aceast fenomen ar putea determina o accelerare a hematopoezei (eritropoezei) în măduva osoasă.

Rezultatele observării la microscop sunt prezentate în figurile 6.4.3.2.1-6.4.3.2.3

S-a observat de asemenea , după 16 doze de extract concentrat de *Allium sativum* administrate , și o creștere în volum a splinei , deși nu se constată o modificare în greutate a splinei ceea ce presupune o dilatare . Prin dilatare , spațiile dintre celulele endoteliale , care delimitează sinusurile sau venulele sunt desfăcute și sângele circulă prin rețeaua deschisă, din capilarele terminale spre sinusuri sau venule.

Această observație este redată în figura 6.4.3.1.

În ceea ce privește afectarea funcției hepatice se observă , după 8 zile de administrare continuă de extract concentrat , apariția unor vacuolizări perinucleare (aceasta presupune o intensificare secretorie a hepatocitelor, o accelerare a biosintezei proteice la nivelul reticulului endoplasmatic rugos.

Se observă de asemenea o ușoară ectazie a capilarelor sinusoidale intralobulare.

După 14 doze se observă o vacuolizare mult mai intensă atât perinucleară cât și citoplasmatică a hepatocitelor (223) .

Se observă o hipertrofie a nucleolilor, consecința fiind o creștere accentuată de sinteză de AND ribozomal (se observă de asemenea o activitate intensă de secreție proteică în hepatocite.

În urma administrării celei de-a 16-a doze , se observă o vacuolizare masivă cu semne de degenerescență a hepatocitelor; în multe celule , cromatina apare condensată în bulgări și apar chiar fenomene de carioliză.

Ectaziile capilarelor sinusoidale sunt mai pronunțate; ca urmare a distrugerii hepatocitelor, printre cordoanele celulare apar nuclei eratici.

Hepatocitele se caracterizează și prin avansarea fenomenului de poliploidie (crește numărul de nucleoli , chiar până la patru nucleoli la aproximativ 20 % dintre hepatocite), ceea ce este reprezentat și în figura 6.4.3.3.

Fenomenul de condensare a cromatinei conduce la micșorarea capacității de regenerare a hepatocitelor (este inhibată mitoza).

Ca urmare a studierii preparatelor histologice pe rinichi , s-au observat următoarele:

După administrarea a 8 doze, se observă o alterare a celor două membrane a capsulei Bowmann, a barierei de filtrare a corpusculilor renali) , respectiv a spațiului dintre foița parietală și viscerală a capsulei, spațiu care este extrem de dilatat (se presupune existența unui efect diuretic).

Canaliculii nefronilor nu prezintă modificări ceea ce presupune o reabsorbție normală.

Fenomenul este general pentru toate secțiunile efectuate la nivelul rinichiului lotului de experiență.

În urma administrării a 14 doze de extract concentrat de *Allium sativum* per os , se constată în continuare, în zona corticală a rinichiului, o dilatare mai accentuată a spațiului dintre membranele capsulei Bowmann: este accelerat procesul de filtrare la nivelul glomerulilor renali ; se observă o lărgire ușoară a canalelor tubilor contorți.

Față de prima recoltare , dilatațiile sunt mai mari.

În ceea ce privește studiul preparatului histologic , după 16 doze de extract administrat, se constată aceleași dilatații ale capsulei Bowmann și distrucția glomerulilor vasculari ai nefronilor.

Apar alterări ale barierei de filtrare , fenomen ce implică și foița viscerală cu podocite ale capsulei Bowmann cât și rețeaua capilară (celule endoteliale) ale glomerulului vascular.

Aspecte degenerative apar și la nivelul canalelor colectoare ale piramidelor renale, unde sunt remarcate desprinderi ale celulelor epiteliale de membrana bazală.

Rezultatele examenului histologic al rinichiului sunt prezentate în figura 6.4.3.4.

SPLINĂ

Figura 6.4.3.1



EXTRACT CONCENTRAT

MARTOR

Concluzii:

- Extractul concentrat implică o serie de modificări la nivelul funcționării normale a splinei, ficatului și rinichiului
- Se constată o dilatare a splinei , ceea ce denotă o hiperfuncție a acesteia

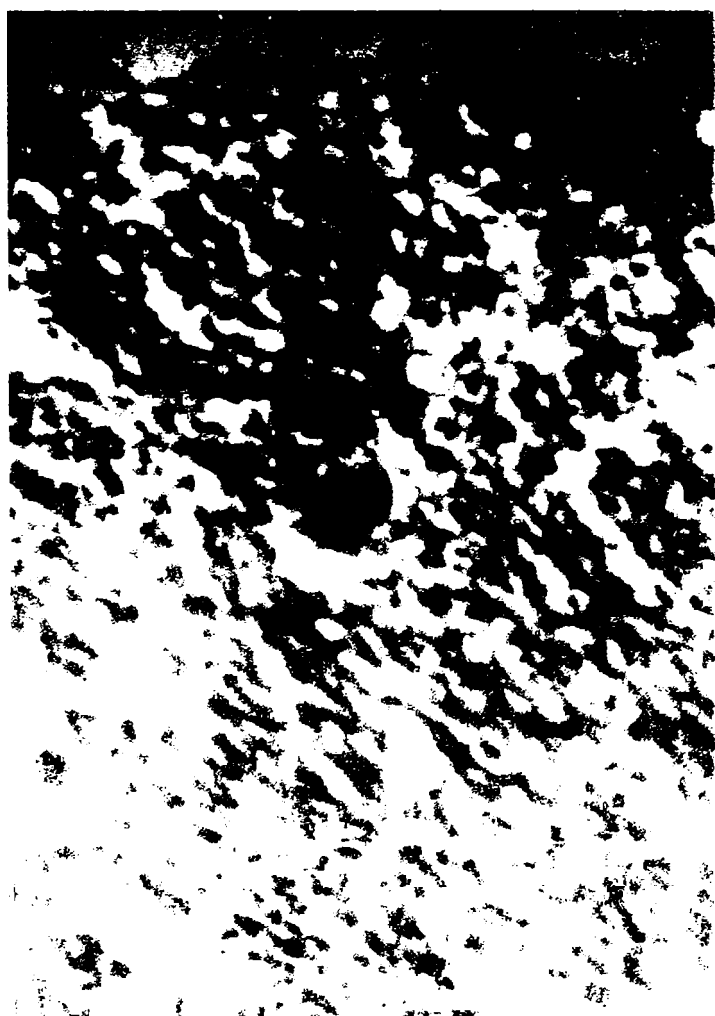
- După administrare unui număr mare de doze(8-16), se constată o proliferare masivă atât în limfonoduli cât și în tecile perifoliculare.
- Semnalarea , în cordoanele celulare perivasculare din pulpa roșie un număr sporit de macrofage și de limfoplasmocite
- Se semnalează apariția corpilor Heinz , în număr de 4-5 / secțiune după 14 doze administrate , respectiv a 3-4 corpi Heinz / 0.031 mm² (aria unui câmp microscopic)
- Intensificarea răspunsului imun imediat (apariția de limfocite proactice)
- În cazul ficatului,o dată cu mărirea numărului de doze se observă o vacuolizare mult mai intensă atât perinucleară cât și citoplasmatică a hepatocitelor.
- Se observă o hipertrofie a nucleolilor, consecința fiind o creștere accentuată de sinteză de AND ribozomal (se observă de asemenea o activitate intensă de secreție proteică în hepatocite).
- Se observă o vacuolizare masivă cu semne de degenerescență a hepatocitelor;
- În multe celule , cromatina apare condensată în bulgări și apar chiar fenomene de carioliză.
- Ectaziile capilarelor sinusoidale sunt mai pronunțate; ca urmare a distrugerii hepatocitelor, printre cordoanele celulare apar nuclei eratici.
- Hepatocitele se caracterizează și prin avansarea fenomenului de poliploidie (crește numărul de nucleoli , chiar până la patru nucleoli la aproximativ 20 % dintre hepatocite)
- Fenomenul de citoliză hepatică se poate corela și cu afectarea activității transaminazelor serice, așa cum au fost prezentate în subcapitolul 6.4.1.
- La nivelul rinichiului se constată dilatații ale capsulei Bowmann și distrucția glomerulilor vasculari ai nefronilor
- Apar alterări ale barierei de filtrare , fenomen ce implică și foița viscerală cu podocite ale capsulei Bowmann cât și rețeaua capilară (celule endoteliale) ale glomerulului vascular.
- Apar aspecte degenerative și la nivelul canalelor colectoare ale piramidelor renale, unde sunt remarcate desprinderi ale celulelor epiteliale de membrana bazală



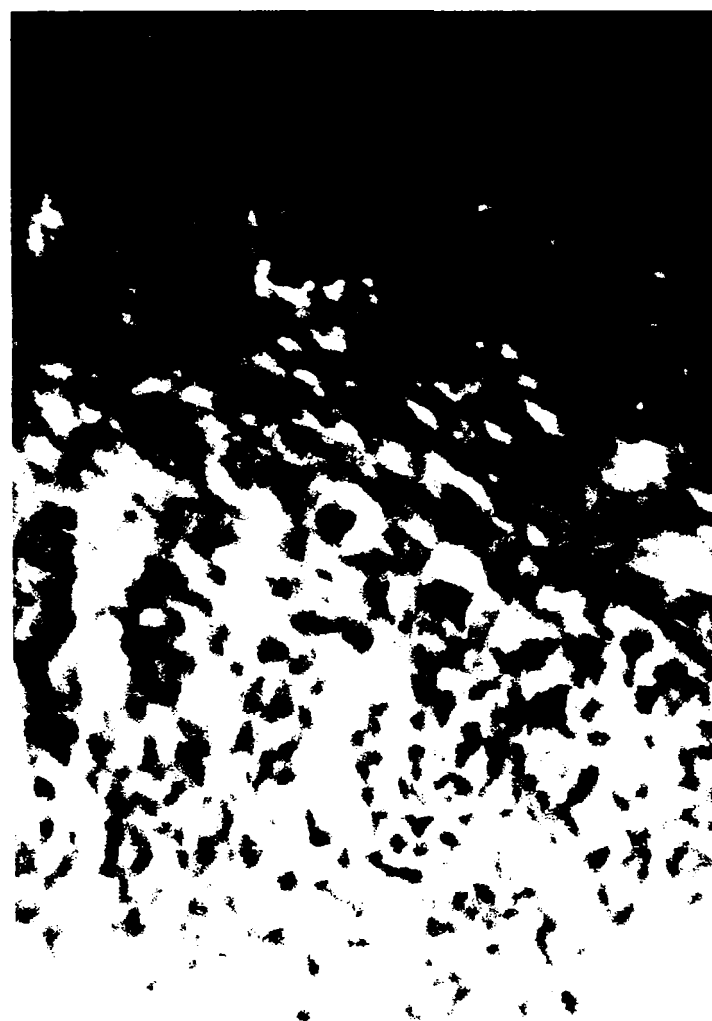
SPLINĂ MARTOR



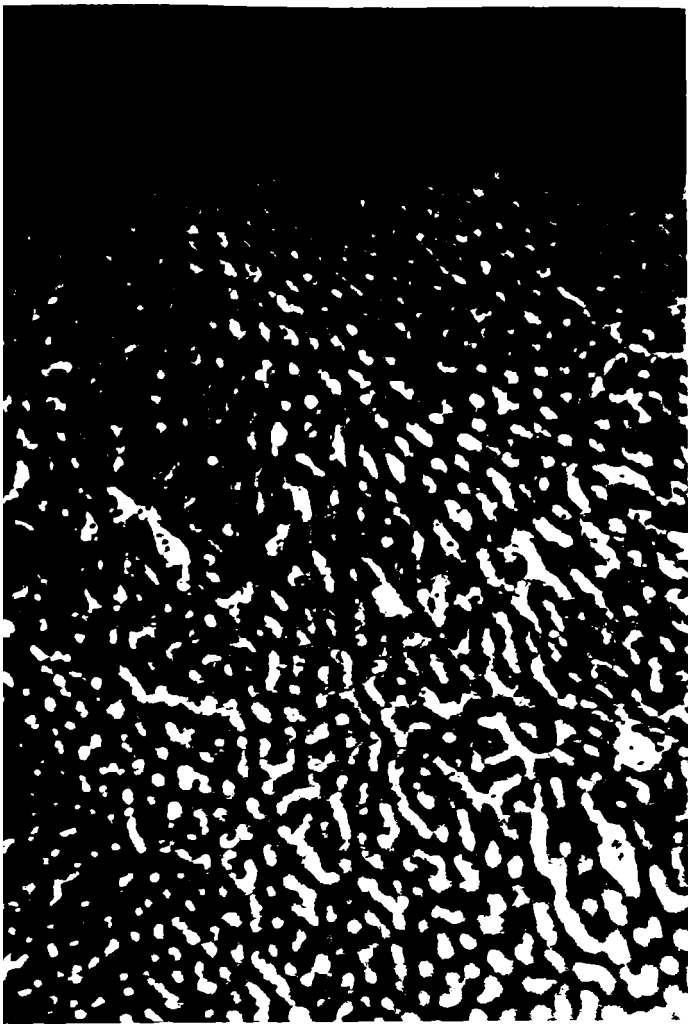
DOZA 8-A AS CONC.



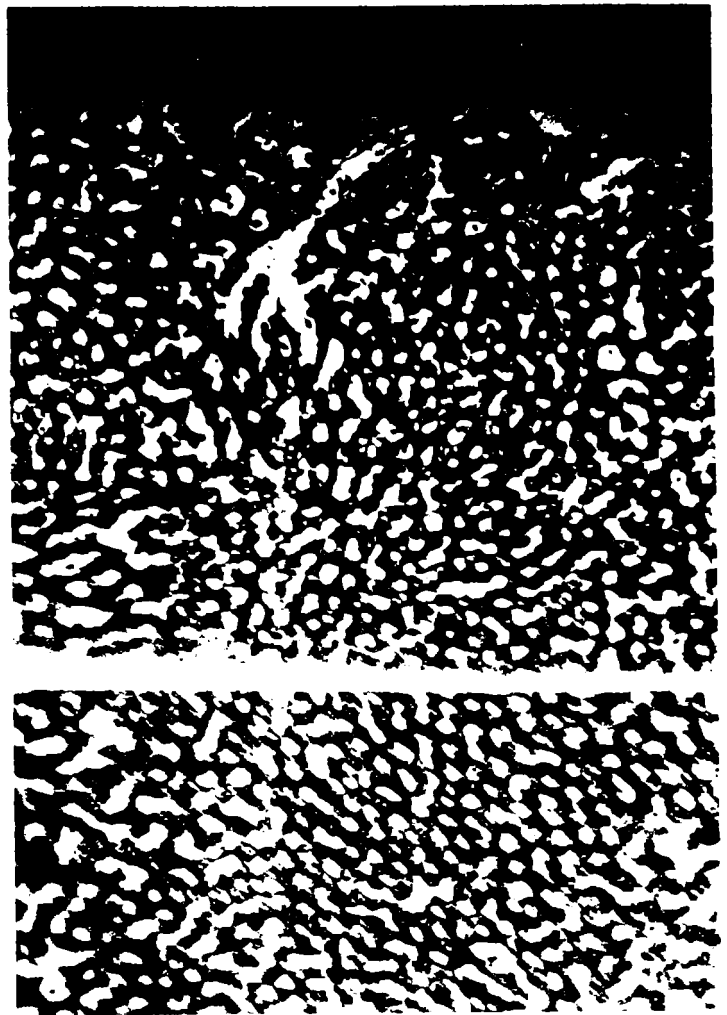
DOZA 14-A AS CONC.



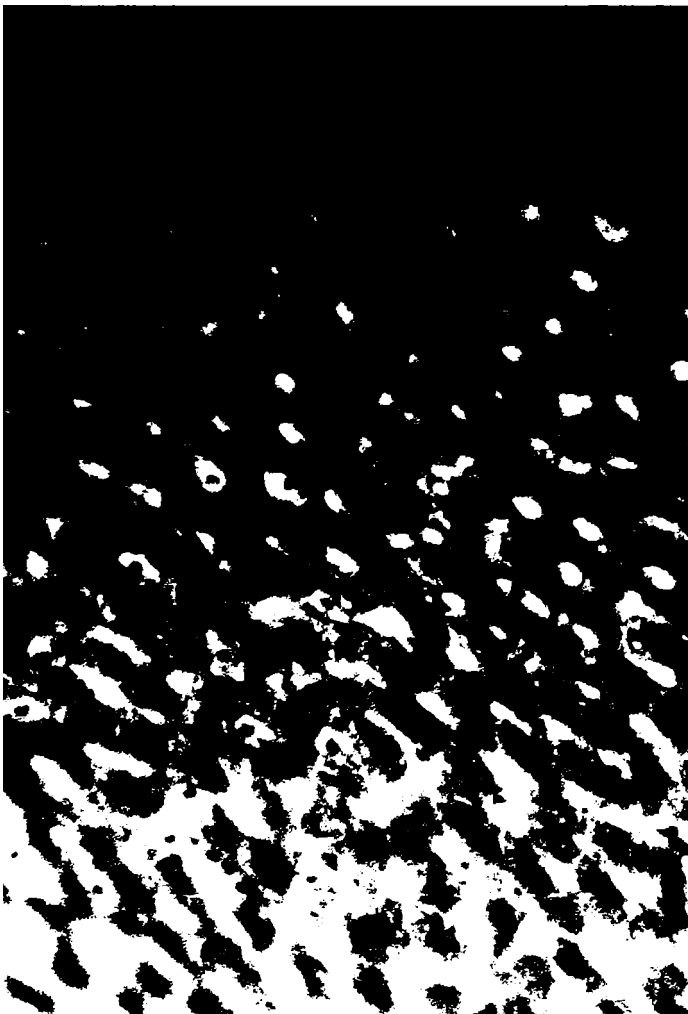
DOZA 16-A AS CONC



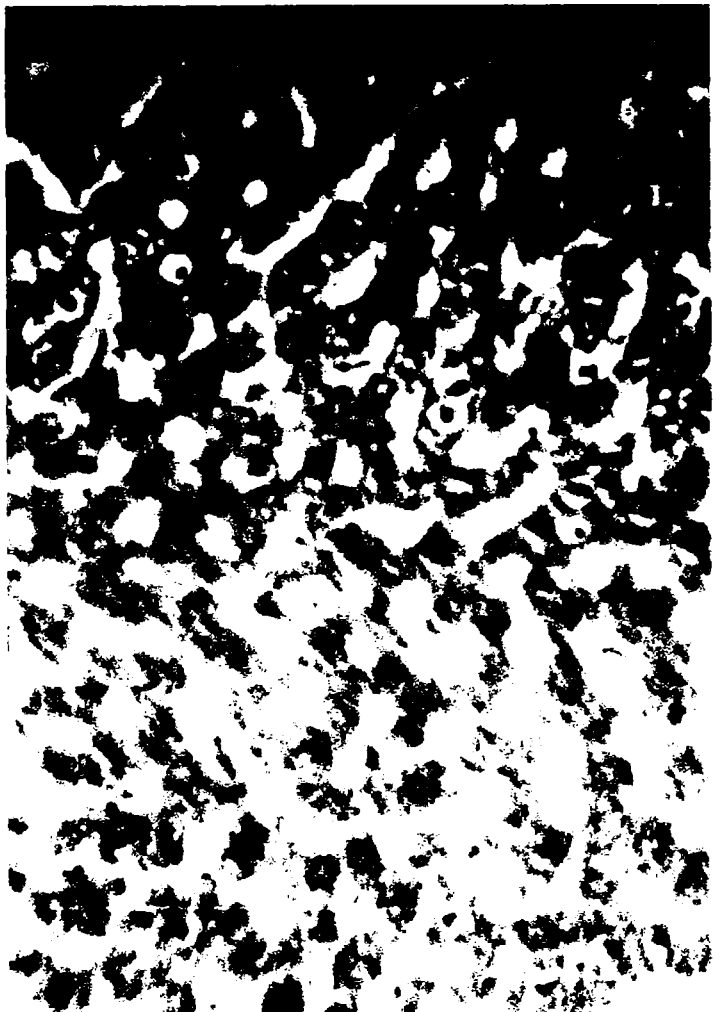
FICAT MARTOR



DOZA 8-A AS CONC.



DOZA 14-A AS CONC.



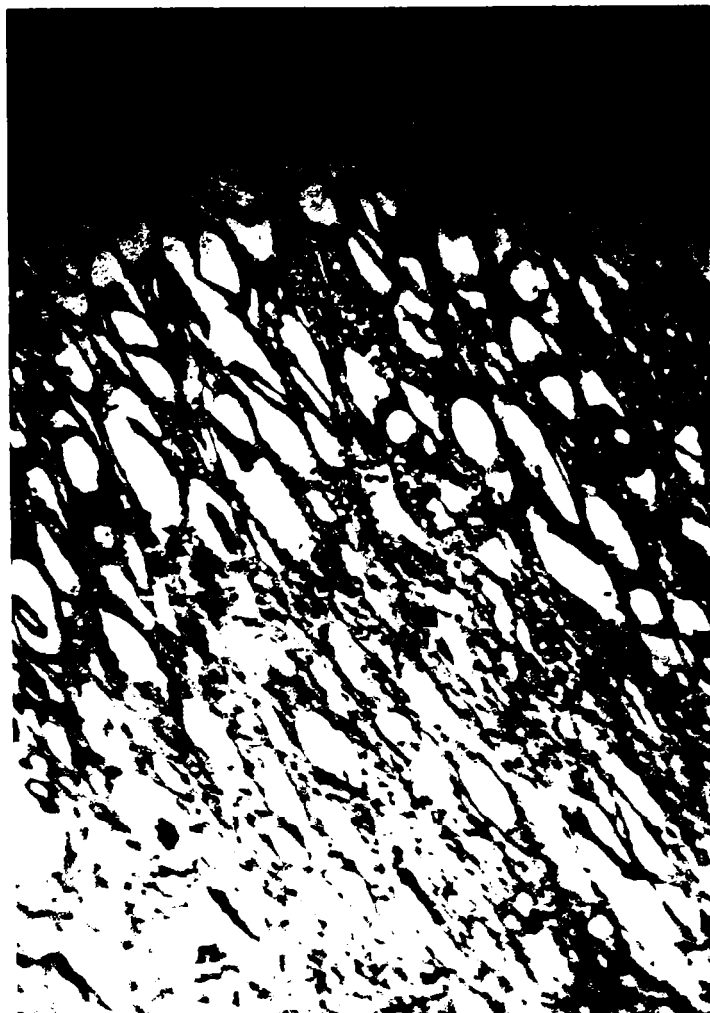
DOZA 16-A AS CONC



RINICHI MARTOR



DOZA 8-A AS CONC.



DOZA 16-A AS CONC.

6.4.4. Modificări survenite la nivelul formulei leucocitare la șobolani tratați cu extract concentrat de *Allium sativum*.

O continuare a studiilor anterioare, prezentate în subcapitolele 6.4.1, 6.4.2 și 6.4.3. , o constituie și determinarea influenței extractelor concentrate asupra formulei leucocitare.

Formula leucocitară reprezintă un examen calitativ și cantitativ al elementelor figurate albe, stabilindu-se procentul fiecărei varietăți de leucocite din mai multe leucocite numărate.

Procentul fiecărei varietăți de leucocite se stabilește cu formula :

$$\frac{\text{Număr leucocite dintr-o clasă} \times 100}{\text{totalul leucocitelor numărate}}$$

Formula leucocitară reprezintă un indiciu deosebit de important cu privire la starea de sănătate a organismului animal, ea suferind modificări semnificative în stări patologice produse de infecții bacteriene, de disfuncții metabolice provocate de influența diferiților factori externi sau interni asupra acestuia(295).

6.4.4.1. Material și metodă

Experimentul s-a efectuat pe 30 de șobolani din rasa Wistar împărțiți în două loturi, în greutate de 250-320g/individ și menținuți în aceleași condiții de întreținere.

Primului lot format din 10 indivizi i s-au administrat zilnic 0.5 ml apă distilată (per os) și a constituit lotul martor, iar celui de-al doilea lot (E) , format din 20 de indivizi i s-a administrat zilnic, per os, 0.5 ml extract concentrat (1.54 mg tiosulfinați/ ml extract).

Experimentul a durat 21 de zile ; s-au efectuat 4 recoltări la interval de 7 zile , s-au prelevat probe de sânge pentru care care au fost obținute frotiuri.

Recoltările de sânge au fost efectuate prin puncție cardiacă; aceasta a necesitat anestezierea anterioară a animalelor cu Ketamină (s-a administrat intraperitoneal în doză de 50mg/kg) .

Frotiurile de sânge au fost obținute prin întinderea unei picături de sânge pe o lamă de sticlă. La recoltare, prima picătură de sânge se îndepărtează , deoarece conține multă limfă și se recoltează a doua picătură, pe latura mică a unei lame șlefuite cu colțul rupt.

Se aplică o ușoară mișcare de lateralitate și se întinde picătura(pe o altă lamă de sticlă) de sânge de la un capăt la altul. Frotiul trebuie să fie subțire, picătura de sânge să nu fie prea mare.

Frotiurile se usucă prin ușoară agitare în aer și se colorează prin metoda panoptică Pappenheim (295) (colorarea cu un singur colorant când s-a obținut o varietate de culori și nuanțe în funcție de structură) ce utilizează ca și reactiv de culoare, reactivul May-Grunwald-Giemsa (MGM).

După aplicarea reactivului , acesta se lasă timp de 40 minute să reacționeze la temperatura laboratorului , după care frotiurile se spală cu apă de robinet și se usucă la aer.

Examinarea frotiurilor s-a efectuat cu ajutorul unui microscop Karl-Zeiss Jena cu obiectivul de imersie (90X).

6.4.4.2 Rezultate și discuții

Rezultatele obținute prin interpretarea frotiurilor sunt prezentate în tabelul 6.4.4.1.

Formula leucocitară la șobolani tratați cu extract concentrat de *Allium sativum*

Tabelul 6.4.4.1.

Lot	Parametri (X ± Sx)	Zile experiment			
		0	7	14	21
Martor	Leucocite totale mii/cm ³	7820± 402	8220 ±245	7998±456	9826±844
	N-E-B-L-M %	16-2-0-76-4	14-1-0-79-6	23-2-0-58-5	19-3-0-71-5
E	Leucocite totale mii/cm ³	8935±550	9772±867	10320±899	9993±689
	N-E-B-L-M %	14-1-0-75-6	24-2-0-69-4	29-2-0-58-11	27-3-1-62-8

unde N= neutrofile, E= euzinofile, B= bazofile, L= limfocite, M= monocite

Din tabel se constată că nu există deosebiri semnificative la șobolanii aflați în experiment, față de valorile normale ale lotului martor (a cărui parametri se situează la

valori similare cu cele indicate de literatura de specialitate (5); o observație remarcabilă a fost legată de tipul limfocitelor circulante ,și anume , aproape 75 % dintre ele manifestau caracteristici evidente de activare; astfel ele au dimensiuni de aproximativ 9-11μm diametrul, cu citoplasma bazofilă și granulațiuni azurofile;

Se observă dimensiuni mari ale nucleului, cu cromatina în două nuanțe de violet , respectiv porțiuni de culoare foarte închisă alternând cu segmente deschise la culoare, aspect ce pledează pentru prezența unor porțiuni de eucromatină mai numeroase decât limfocitele mici inactive și care , demonstrează totodată, prezența unor forme de replicație și transcripție a materialului genetic și respectiv de biosinteză a unor mediatori chimici.

Aceste limfocite active sunt probabil în majoritate limfocite T care elaborează citochine și limfochine; sunt prezente de asemenea și limfocite de tip B (identificate după forma acestora).

Se poate presupune că extractul prezintă o activitate de stimulare a limfocitelor în special în producția de citochine (mediatorii chimici).

Se mai poate constata, la șobolanii din lotul experimental E, și o stimulare a monocitelor , cu aproape 30% față față de valoarea maximă normală a lotului martor, fenomen ce s-ar putea explica printr-o acțiune stimulatorie a extractului în proliferarea monocitelor și ca urmare a activității de fagocitoză exercitată de acestea, în țesuturile conjunctive.

Prin activarea fagocitozei se întărește capacitatea de apărare a organismului față de agenții patogeni, dar se asigură și o refacere celulară și tisulară mai eficace, generată în urma fenomenelor de apoptoză.

Aceste rezultate obținute pe șobolani sunt în concordanță cu rezultatele obținute pe alte specii de animale : suine și tineret taurin , după cum reiese și din rezultatele obținute și prezentate în subcapitolele 6.5.1 și 6.5.2 .

6.4.4.3.Concluzii:

- Formula leucocitară ale lotului experimental se situează la valori similare cu cele indicate de literatură;
- Aproape 75 % dintre limfocitele circulante manifestă caracteristici evidente de activare, iar dintre acestea majoritatea o constituie limfocitele T ; Se poate

presupune că extractul prezintă o activitate de stimulare a limfocitelor în special în producția de citochine (mediatorii chimici);

- Se observă dimensiuni mari ale nucleului, cu cromatina în două nuanțe de violet, care demonstrează prezența unor forme de replicație și transcripție a materialului genetic și respectiv de biosinteză a unor mediatorii chimici;
- La șobolanii din lotul experimental E se constată o stimulare a monocitelor , cu aproape 3 0% față de valoarea maximă normală a lotului martor. Aceasta presupune o acțiune stimulatorie a activității de fagocitoză exercitată în țesuturile conjunctive prin care se întărește capacitatea de apărare a organismului față de agenții patogeni și se asigură și o refacere celulară și tisulară mai eficace.

6.4.5. Influența extractelor concentrate și diluate de *Allium sativum* asupra nivelului colesterolemiei, lipidelor totale și a trigliceridelor serice, la șobolani cu hipercolesterolemie provocată

Grăsimile sunt utilizate ca materiale energetice de majoritatea țesuturilor. Mai mult decât atât, pentru miocard, mușchi scheletici, rinichi, acizii grași sunt metabolizați în mod preferențial. Țesutul adipos îndeplinește funcții speciale în stocarea rezervelor energetice sub forma de grăsimi și punerea lor în circulație în momente de necesitate.

În ficat surplusul de glucide alimentare este transferat în grăsimi, ca apoi acestea să fie transportate spre țesuturile extrahepatice spre a fi utilizate imediat, iar ceea ce prisosește este depozitat în țesutul adipos.

Aproximativ o treime din acizii grași liberi sunt reținuți în ficat, independent de concentrația lor plasmatică. La niveluri joase pătrund în ficat cantități moderate de acizi grași, care sunt distribuiți pe diverse căi metabolice. La concentrații ridicate de acizi grași liberi ficatul este însă invadat de acești compuși de care urmează să se debaraseze. Căile principale de utilizare a acizilor grași sunt:

- Degradarea oxidativă pentru mobilizarea de energie; cantitățile de acizi grași pot fi metabolizate însă limitat în funcție de nevoile de ATP ale celulelor, respectiv de energia metabolică necesară.
- Încorporarea acizilor grași în trigliceride și exportul lor ca lipoproteine cu densitate foarte mică spre țesuturile extrahepatice.
- Conversia acizilor grași în corpi cetonic (cetogeneza) a căror biosinteză se realizează pornind de la acetil-SCoA

Un alt compus lipidic esențial este **colesterolul** care îndeplinește în organism următoarele funcții:

- În stare liberă sau sub forma de esteri participă la edificarea structurii lipoproteice celulare și a lipoproteinelor solubile din plasmă. Creierul și în special substanța nervoasă albă este foarte bogată în colesterol. Spre deosebire de alte țesuturi care cuprind în special esteri ai colesterolului, în substanța nervoasă se află numai colesterol liber.

Conținutul în colesterol al creierului și al nervilor crește în perioada de mielinizare după care rămâne aproape constant tot restul vieții.

După sistemul nervos ficatul este al doilea țesut în ceea ce privește conținutul total în colesterol și acesta se află în cea mai mare parte esterificat. Colesterolul hepatic, spre deosebire de cel cuprins în creier și nervi are o activitate metabolică foarte ridicată.

-colesterolul este precursorul hormonilor steroidici, a hormonii corticosuprarenali și a celor gonadici

-colesterolul este materia primă pentru sinteza acizilor biliari.

- Din colesterol se sintetizează în organism vitamina D3 (colecalfirolul)

Colesterolul, liber sau sub formă de esteri se află în plasmă în diverse fracțiuni lipoproteice, chilomicroni, lipoproteine cu densitate mică și cu densitate mare.

Enzima care catalizează reacția de esterificare a colesterolului este denumită lecitină → colesterol acil transferază (LCAT). Prin esterificare, colesterolul din lipoproteine este temporar imobilizat, prevenindu-se în acest fel trecerea rapidă și necontrolată a colesterolului din plasmă în țesuturi. La persoanele la care enzima LCAT este absentă sau deficitară, raportul colesterol total / colesterol esterificat crește prin scăderea numitorului.

Colesterolul liber furnizat celulelor de β -lipoproteine (LDL) exercită o acțiune represivă asupra sintezei de novo a colesterolului, prin inhibiția HMG-Co A reductazei (β -hidroxi-metil glutaril-CoA), sinteza colesterolului în țesuturile extrahepatice este menținută la un nivel scăzut.

Această cale intervine și la menținerea colesterolului plasmatic de către β -lipoproteine (LDL). Numărul de receptori pentru β -lipoproteine variază cu cantitatea de particule lipoproteice la care sunt expuse celulele. Există o relație inversă între concentrația LDL și numărul de receptori. În acest fel se previne acumularea colesterolului în celule(330).

Datorită prezenței dublelor legături în stuctura grăsimilor, există posibilitatea, ca sub acțiunea oxigenului, să intervină fenomenul de peroxidare respectiv de autooxidarea acestora ceea ce poate conduce la transformarea lor în radicali peroxidici.

Procesul de autooxidare decurge prin intermediul radicalilor liberi, și anume: inițierea unei reacții în lanț, propagarea reacției în lungul lanțului și reacția de terminare.

Reacția în lanț poate fi inițiată prin atacul oricărui radical liber asupra unui substrat favorabil, cei mai potriviți fiind radicalii formați prin descompunerea unui peroxid aflat în compoziția substratului ca impuritate. Astfel pe măsura avansării autooxidării aceasta își generează propriul său catalizator-peroxid.

Prezența acestor radicali peroxidici conduce la declanșarea a numeroase transformări biochimice ale organelor și țesuturilor, extrem de dăunătoare organismelor animale (231). Aceste neajunsuri au fost prezentate în partea introductivă a tezei.

Deși în literatura de specialitate a fost intens studiat atât efectul antioxidant cât și cel hipolipemiant al plantei *Allium sativum*, până în prezent nu a putut fi explicat mecanismul de acțiune al acesteia(170).

În acest sens, noi am inițiat un studiu în acest domeniu privind influența administrării unor extracte apoase de *Allium sativum* asupra organismelor vii cărora li s-a provocat hipercolesterolemie .

Au fost studiați următorii parametri biochimici : colesterolul, lipidele totale , trigliceridele precum și pentru a observa gradul de afectare al ficatului s-a studiat și activitatea transaminazelor alanin amino-transferaza (ALAT) și aspartat amino-transferaza (ASAT).

6.4.5.1. Material și metodă :

Experimentul s-a efectuat pe 120 de șobolani de rase Wistar, împărțiți în 4 loturi a câte 30 de indivizi fiecare. Greutatea corporală a șobolanilor a fost cuprinsă între 250-350g. Condițiile de hrănire și întreținere au fost aceleași pe toată durata experimentului.

Experimentul s-a desfășurat pe o perioadă de 21 zile.

Înainte de sacrificare s-a făcut anestezie cu Ketamină 0,2 ml/individ intraperitoneal, prelevarea sângelui a fost efectuată prin puncție cardiacă, pe anticoagulant (Heparină - 5000 U).

La fiecare sacrificare s-au utilizat câte 10 șobolani din fiecare lot; ca urmare au fost efectuate trei recoltări de sânge după 14 zile, 19 zile și 21 de zile de la începutul experimentului.

Modul de administrare a grăsimii și a extractelor de *Allium sativum*:

- Primului lot s-a administrat zilnic grăsime cu un conținut 108 mg% colesterol (4 g grăsime/individ).

- Lotului al 2-lea i s-a administrat 4 g grăsime/individ/zi, iar din ziua a 4-a a experimentului i s-a administrat per os și 0,5 ml/individ extract diluat (0,118g tiosulfinați/100ml extract respectiv 0,068g alicină/100ml extract)
- Lotului al 3-lea i s-a administrat 0,5 ml/individ extract concentrat 0,58g tiosulfinați/100ml extract respectiv 0,34g alicină /100ml extract
- Lotul al 4-lea a servit drept martor și i s-a administrat 0,5 ml H₂O per os.

Cantitatea de colesterol din grăsimea administrată a fost determinată din grăsimile totale nesaponificabile, conținute în hrana administrată. Lipidele totale au fost determinate prin metoda Soxhlet de extracție cu solvenți (178).

Metodele generale de determinare a parametrilor au fost următoarele:

Dozarea colesterolului total prin metoda cu clorură ferică (178)

Colesterolul în prezența acidului sulfuric concentrat și a acidului acetic glacial reacționează cu clorura ferică cu formarea unui complex colorat în violet, cu un maxim de absorbție la $\lambda=550$ nm.

Intensitatea culorii formate este direct proporțională cu cantitatea de colesterol intrat în reacție.

Mod de lucru:

În trei eprubete se pipetează:

Reactiv	Proba	Martor	Etalon
Ser (ml)	0,1	—	—
Etalon (ml)	—	—	0,1
Acid acetic glacial (ml)	2,9	3,0	2,9
Soluție FeCl ₃ 0,1% în acid acetic glacial (ml)	2,0	2,0	2,0

Se amestecă și după răcire se determină densitatea optică la $\lambda=550$ nm.

Calculul s-a efectuat după formula :

$$\text{mg colesterol / 100ml ser} = \frac{E_{proba}}{E_{etalon}} \cdot c_{etalon} \cdot 100$$

$c_{etalon} = 400\text{mg colesterol \% acid acetic glacial}$

Determinarea lipidelor totale (178)

Lipidele totale serice formează în mediu acid, la fierbere, un compus de culoare roșie cu un maxim $\lambda=530\text{nm}$.

Determinarea implică hidroliza lipidelor în mediu acid urmată de transformarea acizilor grași eliberați în carbocationi, care la rândul lor vor reacționa cu fosfovanilină formând un compus colorat roșu-violaceu. Concentrația lipidelor este direct proporțională cu intensitatea culorii.

Mod de lucru : S-a procedat după următoarea schemă :

Reactiv	Probă	Etalon	Metron
Se	0.1	—	—
Soluție etalon de trioleină (1g/100ml acid ortofofosoric)	—	0.1	—
Ser fiziologic	—	—	0.1
#50-98%	4.0	4.0	4.0
Se fierb probele timp de 10 minute , pe baia de apă			
Probele se răcesc imediat sub jet de apă, după care se adaugă :			
	0.1	0.1	0.1
Soluție fosfovanilină (1g/100ml acid ortofofosoric)	2.0	2.0	2.0

Se agită puternic și se răcesc probele într-un curent de apă , după care se lasă în repaus pentru dezvoltarea culorii timp de 30 minute și se determină densitatea optică la $\lambda =530\text{nm}$.

Calculul s-a efectuat după următoarea formulă:

$$\text{mg lipide totale / 100ml ser} = \frac{E_{\text{proba}} - E_{\text{maritor}}}{E_{\text{etalon}} - E_{\text{maritor}}} \cdot C_{\text{etalon}} \cdot 100$$

unde $C_{\text{etalon}} = 1\text{g trioleină/100 ml ser}$

Determinarea trigliceridelor din ser (178)

Trigliceridele serice , prin saponificare pun în libertate glicerină , care în prezența acidului periodic, este oxidată la aldehydă formică. Aldehyda formică reacționează cu fenilhidrazina în mediu acid, formând un produs de condensare colorat roșu- cărămiziu.

Mod de lucru:

Într-o eprubetă de centrifugă s-au măsurat 0.1 ml ser și 0.5 ml soluție alcoolică de KOH4%; într-o altă eprubetă de centrifugă se introduc 0.1 ml soluție etalon de trioleină și 0.5 ml soluție alcoolică de KOH 4%.

Conținutul eprubetelor s-a încălzit pe baie de apă la 60°C timp de 30 de minute. După răcire , în fiecare eprubetă s-a adăugat 1 ml soluție sulfat de magneziu 3.7% și 3 ml apă distilată.

După agitare, precipitatul de hidroxid de magneziu format, a fost îndepărtat prin centrifugare.

În continuare s-a respectat următorul mod de lucru:

Reactivi	Probă	Etalon	Maror
ml	ml	ml	ml
Suspensia de la centrifugare	1.0	—	—
Soluție etalon	—	0.1	—
Apă distilată	—	—	0.1
Ser	1.0	1.0	1.0
Soluție etalon de NaOH 0.05M	0.2	0.2	0.2
Se agită puternic și se lasă în repaus , la întuneric, timp de 10 minute			
Benzilhidrazina 1%	0.5	0.5	0.5
Se lasă în repaus, la întuneric 10 minute			
HCl 5N	2.0	2.0	2.0

După 15 minute, timp în care s-a perfectat reacția, probele s-au fotometrat la $\lambda=530\text{nm}$.

Calculul s-a efectuat aplicând formula :

$$\text{mg trigliceride/100ml ser} = \frac{E_{\text{proba}} - E_{\text{maror}}}{E_{\text{etalon}} - E_{\text{maror}}} \cdot C_{\text{etalon}} \cdot 100$$

unde $C_{\text{etalon}} = 100\text{mg trioleină}\%$

Transaminazele alanin aminotransferază (ALAT) și aspartat aminotransferaza (ASAT) au fost determinate prin metoda colorimetrică cu 2,4-dinitrofenil hidrazina , prezentată în subcapitolul 6.4.1.

6.4.5.2. Rezultate și discuții

6.4.5.2.1. Valorile colesterolului total la șobolanii tratați cu extract de Allium Sativum

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 6.4.5.1. și graficul 6.4.5.1

Valorile colesterolului total la șobolanii tratați cu extracte de Allium Sativum

Tabelul 6.4.5.1

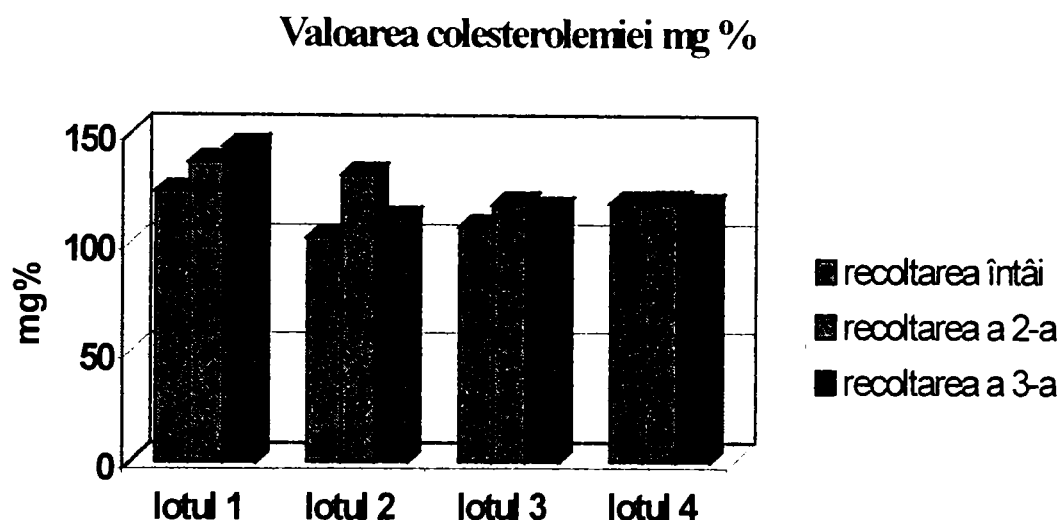
Nr. lot	Grup control (n=15/zi)	Allium sativum (n=15/zi)	Aspartat (n=15/zi)
1	123,5 ± 1,07	137,29 ± 1,72	144,33 ± 1,35
2	102,7 ± 1,30	131,42 ± 1,30	111,1 ± 0,87
3	107,4 ± 0,92	118 ± 0,57	115,5 ± 1,31
4	118,5 ± 0,52	118,51 ± 0,60	117,46 ± 0,98

Lotul 1 – colesterol; lotul 2 – colesterol + extract + colesterol; lotul 3 – extract concentrat (fără colesterol) ; lotul 4 – martor

La lotul 1 hrănit în exclusivitate cu hrană îmbogățită în lipide, se observă o creștere a valorii colesterolemiei pe tot parcursul experimentului, ajungând în cea de-a 22-a zi, de la valoarea de 123,5 mg% la o valoare de 144,33 ± 1,35 mg%, ceea ce reprezintă valori cu 4,39% respectiv 22% mai mari decât martorul.

La cel de-al doilea lot, căruia i s-a administrat extract de Allium Sativum, după 3 zile de la începutul experimentului se observă o scădere a valorii colesterolemiei față de lotul 1, la 102,7 ± 1,30 mg% ceea ce reprezintă o valoare cu 16,84% mai scăzută față de lotul cu colesterol, respectiv cu 13,34% față de lotul martor, a cărui valoare a colesterolului se situează la 118,5 ± 0,52 mg%.

O scădere a colesterolemiei se înregistrează și la lotul 3 tratat cu extract concentrat de *Allium Sativum*. Valoarea acesteia se situează la $107,4 \pm 0,92$ mg%, ceea ce reprezintă o scădere cu 10% față de valoarea martorului.



La cea de-a doua recoltare care s-a efectuat în a 19-a zi a experimentului se constată următoarele:

La lotul 1, colesterolemia crește în continuare; aceasta se situează la o valoare medie de $137,28 \pm 1,72$ mg% ceea ce reprezintă o creștere cu 15,8% față de valoarea martorului, pe când la lotul 2 se înregistrează o creștere a valorii colesterolemiei $131,48 \pm 1,30$ mg%, cu 10,9% față de martor, iar la lotul 3 o creștere cu 13,29% față de martor; aceste creșteri s-ar putea explica printr-o stimulare a sintezei de colesterol în primele zile de administrare a extractului.

Aceste date sunt confirmate și de date recente din literatura de specialitate (270). Spre deosebire de această stare de fapt, în primele zile de administrare a extractului, iar în cea de-a 21-a zi a experimentului se observă o nouă scădere a valorii colesterolemiei la toate loturile tratate cu *Allium Sativum*, cu 18,3% la lotul 2 și respectiv cu 5,2% la lotul al 3-lea tratat cu extract concentrat, față de valoarea colesterolemiei la lotul martor.

Se poate concluziona că prin administrarea de extract de *Allium Sativum*, chiar la indivizi cu hipercolesterolemie provocată se poate ajunge la o scădere a valorii colesterolului în plasmă, care să ajungă chiar sub valoarea martorului.

Această scădere a hipercolesterolemiei s-ar putea explica printr-o blocare a biosintezei de colesterol de către compușii cu sulf conținuți în extractul de *Allium Sativum*, la nivelul acetil-SCoA.

6.4.5.2.2. Valorile lipidelor totale la șobolani tratați cu extract de *Allium sativum*

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 6.4.5.2 și graficul 6.4.5.2.

Similar cu comportarea valorilor colesterolemiei se observă o evoluție asemănătoare dar mai pregnantă la nivelul lipidelor totale, la loturile cărora li s-au administrat extracte de *Allium sativum*.

Valorile lipidelor totale (mg%) la șobolani tratați cu extracte de *Allium sativum*

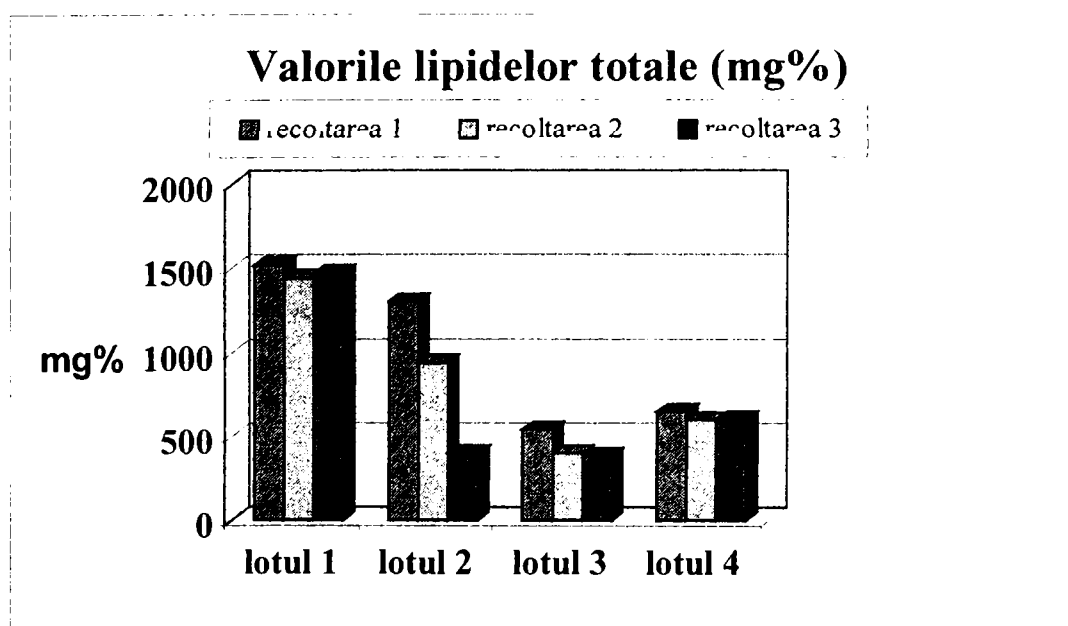
Tabelul 6.4.5.2

Nr. lot	prima recoltare (a 14-a zi)	A 2-a recoltare (a 19-a zi)	a 3-a recoltare (a 21-a zi)
1	1520±10.3	1440±12.7	1470±9.3
2	1300±7.3	940±5.2	400±8.5
3	540±4.5	400±2.5	380±5.7
4	650±3.7	600±7.2	606.8±5.8

Lotul 1 – colesterol; lotul 2 – colesterol + extract + colesterol; lotul 3 – extract concentrat (fără colesterol); lotul 4 – martor

La lotul 1 s-au determinat valori ce se situează la o medie de 1470 ±9.3 mg%, cu 242.5% mai mari față de valoarea martorului.

Graficul 6.4.2



La lotul 2 căruia i s-a administrat extract de *Allium sativum* per os ,ulterior hrănirii exclusive cu grăsimi, s-a constatat că în a 14-a zi a experimentului (3 zile de administrare de extract) valoarea lipidemiei se situează la valori de 1300 ± 7.3 mg % , cu 15% mai scăzute față de lotul 1 hrănit exclusiv cu hrană îmbogățită în lipide. La cea de a doua recoltare (după 7 administrări de extract) s-a înregistrat o valoare de 940 ± 5.2 mg % , ceea ce reprezintă reprezintă o scădere cu 28.7% față de valoarea obținută la prima recoltare. La cea de-a treia recoltare , după 21 de zile de experiment , respectiv la 11 administrări de extract s-a obținut o valoare medie a lipidelor totale de 400 ± 8.5 mg % , ceea ce arată o revenire la valori apropiate de ale martorului, reprezentând o scădere de 3.25 ori față de valoarea lipidemiei după prima recoltare.

La lotul al 3-lea , căruia nu i s-a administrat hrană îmbogățită în lipide, dar căruia i s-a administrat extract concentrat de *Allium sativum*, per os, s-a observat o scădere a lipidemiei față de martor , cu 20 % după 7 zile de administrare a extractului, respectiv cu 59.47 % după 11 zile de administrare a extractului concentrat.

În ceea ce privește variația lipidelor totale în plasmă , în urma administrării per os de *Allium sativum*, s-a constatat o evidentă influență pozitivă asupra scăderii lipidemiei.

Chiar în cazul unei hrane bogate în lipide, administrarea de *Allium sativum* duce la scăderea acestora la valori similare cu a valorilor normale din literatura de specialitate sau chiar la o scădere sub aceste valori.

6.4.5.2.3. Valorile trigliceridelor (mg%) la șobolanii tratați cu extracte de *Allium sativum*

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 6.4.5.3. și graficul 6.4.5.3.

În urma operațiunii de prelevare de sânge, după 14 zile de administrare de hrană îmbogățită în lipide, cu un conținut de 108 mg colesterol %, la primul lot s-a înregistrat o valoare a trigliceridelor de 46.2 ± 1.25 mg% situată la valori similare cu a lotului martor.

Variații mici ale cantității de trigliceride se înregistrează și la următoarele două recoltări, astfel ca la sfârșitul experimentului , să se situeze la valoarea medie de 55.6 ± 1.40 mg%, cu 17% mai ridicată decât după prima recoltare, dar la valori apropiate de limita minimă a valorilor de referință.

Valorile trigliceridelor (mg%) la șobolanii tratați cu extracte de *Allium sativum*

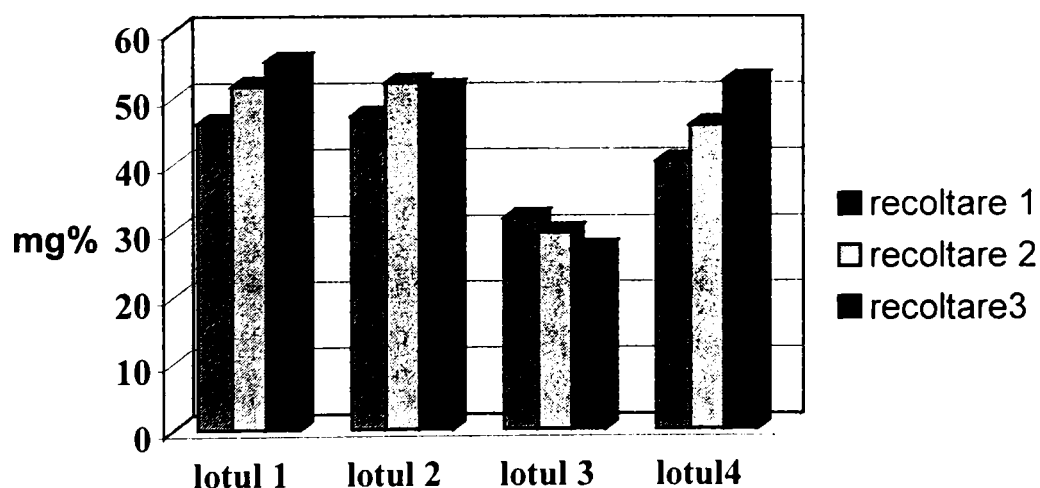
Tabelul 6.4.5.3

Nr. lot	prima recoltare (a 14-a zi)	a 2-a recoltare (a 19-a zi)	a 3-a recoltare (a 21-a zi)
1	46.2±1.25	51.8±0.91	55.6±1.40
2	47.3±0.85	52.3±1.20	51.5±0.70
3	31.9±1.20	29.72±1.17	27.1±0.92
4	40.5±0.71	45.94±0.85	52.65±0.50

Lotul 1 – colesterol; lotul 2 – colesterol + extract + colesterol; lotul 3 – extract concentrat (fără colesterol) ; lotul 4 – martor

Graficul 6.4.5.3.

Valoarea trigliceridelor (mg%)



În ceea ce privește lotul al 2-lea, se observă că nivelul trigliceridelor se situează la valori medii de 47.3±0.85, după prima recoltare , la 52.3±1.20 mg% la cea de-a 2-a recoltare și respectiv la 51.5±0.70, la sfârșitul experimentului . Aceste valori sunt foarte apropiate de cele ale lotului martor.

La lotul al 3-lea , căruia i s-a administrat exclusiv extract concentrat de *Allium sativum* (0.58g tiosulfinați/ml extract de *Allium sativum*) , se constată o scădere continuă a nivelului trigliceridelor , de la 31.9 ±1.20 mg% până la 27.1±0.92 mg% (cu 42 %) față de valorile

trigliceridelor înregistrate la martor. Nivelul trigliceridelor la acest lot se găsesc la valori mai scăzute decât valorile minime de referință a trigliceridelor.

Se poate concluziona că o concentrație mai mare în *Allium sativum* (11.6mg tiosulfinați /kgcorp/zi) față de 2.36 mg tiosulfinați/kg corp/zi conduce la o scădere substanțială (cu 42%) a trigliceridelor față de valoarea trigliceridelor a lotului martor.

Administrarea extractului diluat (0.118 g tiosulfinați/100ml extract) nu a influențat valoarea trigliceridelor în mod semnificativ.

6.4.5.2.4. Valorile activității alanin aminotransferazei (ALAT) la șobolani cu hipercolesterolemie indusă, tratați cu *Allium sativum*

Rezultatele obținute în cadrul studiului activității alanin aminotransferazei (ALAT) la șobolani cu colesterolemie indusă, cărora li s-au administrat diferite extracte de *Allium Sativum* sunt prezentate în tabelul 6.4.5.4. și graficul 6.4.5.4.

Din valorile activității alanin aminotransferazei (ALAT) la primul lot, a cărui hrană a fost îmbogățită în lipide se observă o ușoară creștere a activității enzimei, ceea ce denotă o activitate mai intensă a ficatului, activitate influențată în mare măsură de prezența unei cantități suplimentare de lipide. Activitatea enzimei se situează la valori de 48,73 U.I. cu 39,2% mai mari decât a valorii medii normale citată în literatura de specialitate.

Spre deosebire de primul lot, la cel de-al doilea lot, cărui i s-a administrat timp de 14 zile extract diluat de *Allium Sativum* 0,5 ml/individ/zi, se observă că după administrarea a 3 doze de *Allium Sativum*, valoarea activității enzimei ALAT se situează la $32,11 \pm 1,03$ U.I. Această valoare este similară cu valoarea normală a activității enzimei, ca după 7 doze, respectiv 11 doze activitatea enzimei să crească din nou, astfel că la ultima recoltare să se situeze la valori de $45,30 \pm 0,31$ U.I., adică cu 29,42% mai ridicată decât a valorilor determinate din literatura de specialitate, respectiv cu 13,73% mai mare față de martor.

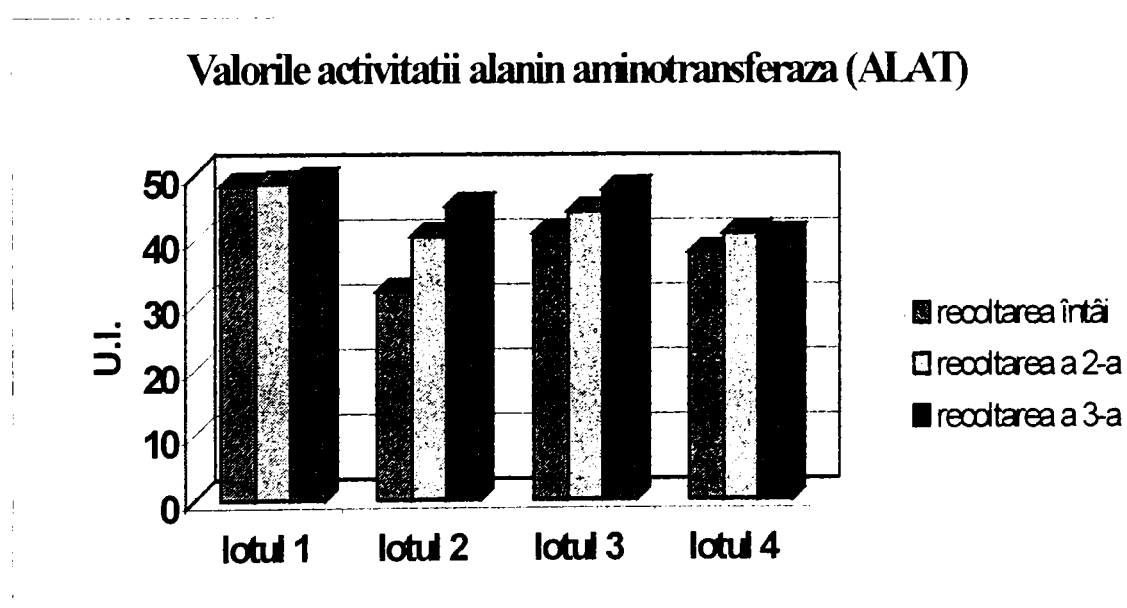
La lotul 3 tratat exclusiv cu extract concentrat de *Allium Sativum*, valorile activității ALAT se situează la valori peste limita maximă a valorii normale indicată de literatura de specialitate, adică la valori cu aproximativ 19,5% mai mari.

Valorile activității alanin aminotransferazei (ALAT) (U.I.) la șobolani cu hipercolesterolemie indusă, tratați cu *Allium sativum*

Tabelul 6.4.5.2.4.

Nr. lot	prima recoltare a 14-a zi	a 2-a recoltare a 19-a zi	a 3-a recoltare a 21-a zi
1	48,32 ± 1,31	48,71 ± 0,42	49,16 ± 0,56
2	32,11 ± 1,03	40,64 ± 1,12	45,30 ± 0,31
3	41,10 ± 0,52	44,40 ± 0,78	47,82 ± 0,54
4	38,03 ± 0,31	41,07 ± 0,42	40,42 ± 0,77

Graficul 6.4.5.4.



Aceste valori mai ridicate ale activității ALAT față de cele normale, respectiv ale valorilor martorilor s-ar putea datora unui răspuns al ficatului atât la hrana îmbogățită în lipide cât și efectului administrării extractului de *Allium Sativum*. Aceste date confirmă cercetările anterioare (226).

6.4.5.2.5. Valorile activității aspartat aminotransferazei (ASAT) la șobolani cu hipercolesterolemie indusă, tratați cu *Allium Sativum*

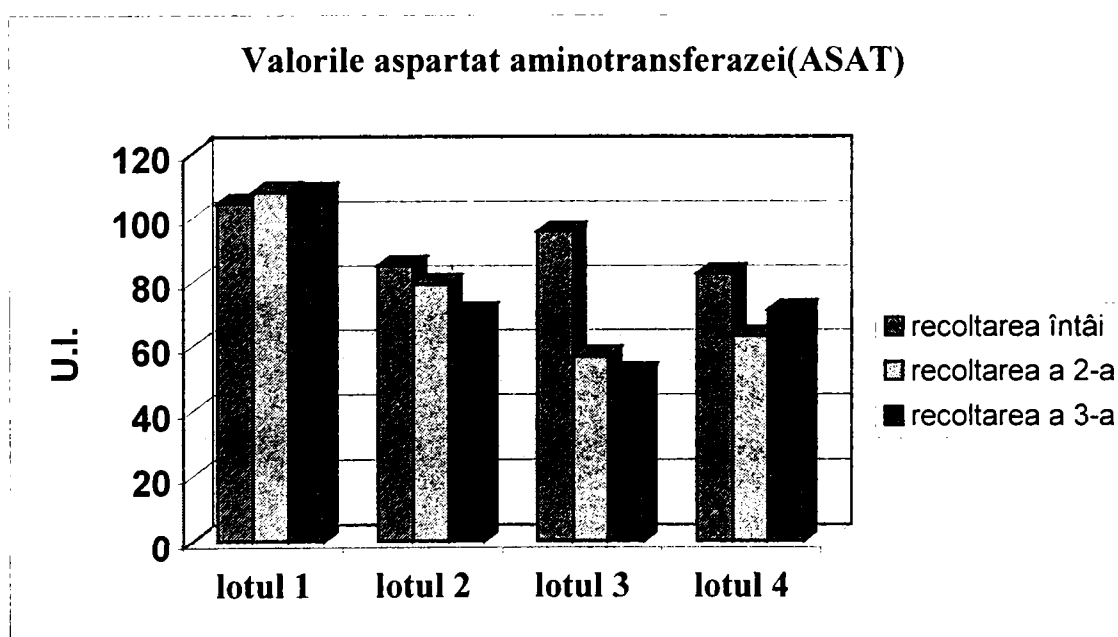
Rezultatele obținute în cadrul studiului activității aspartat aminotransferazei (ASAT) la șobolani cu hipercolesterolemie indusă, cărora li s-au administrat diferite extracte de *Allium Sativum* sunt prezentate în tabelul 6.4.5.5 și graficul 6.4.5.5.

Valorile activității aspartat aminotransferazei (ASAT) (U.I.) la șobolani cu hipercolesterolemie indusă, tratați cu *Allium Sativum*

Tabelul 6.4.5.5

Nr. lot	prima recoltare a 14-a zi	a 2-a recoltare a 19-a zi	a 3-a recoltare a 21-a zi
1	104,4 ± 2,34	108,02 ± 1,22	107,79 ± 1,21
2	84,96 ± 1,57	79,23 ± 2,21	70,33 ± 2,71
3	95,56 ± 2,01	56,84 ± 1,33	51,66 ± 1,56
4	82,51 ± 1,77	63,06 ± 1,52	71,06 ± 1,03

Graficul 6.4.5.5.



Rezultatele relevă, ca și în cazul alanin aminotransferazei, o afectare clară a activității ficatului în urma administrării de hrană îmbogățită în lipide. Acest lucru este evident în cazul lotului 1, a cărui activitate ASAT se situează la sfârșitul experimentului (după 21 zile de la

începutul acestuia), la valoarea de $107,97 \pm 1,21$ U.I. Aceste valori sunt similare cu cele obținute la recoltările precedente, toate situându-se la valori cu 68,65% mai mari față de valoarea normală indicată în literatura de specialitate (74 ± 13 U.I.), respectiv cu 67,12% față de valoarea medie a martorului.

În ceea ce privește activitatea enzimei la lotul al 2-lea, se observă o diminuare a activității enzimei la valori, după prima recoltare ($84,96 \pm 1,57$ U.I) mai scăzute cu 18,7% față de cele ale lotului 1. Activitatea enzimei continuă să scadă în urma administrării a 7 doze, respectiv a 11 doze de extract diluat de *Allium Sativum*, până la o valoare de $70,33 \pm 2,71$ U.I., cea ce reprezintă o diminuare a activității enzimei cu 32,38% față de prima recoltare.

În cazul celui de-al 3-lea lot, căruia i s-a administrat exclusiv extract de *Allium sativum* concentrat, fără a i se îmbogăți dieta zilnică cu lipide, se constată o diminuare și mai pregnantă a activității ASAT;

Astfel în urma administrării a 11 doze de *Allium Sativum* pe individ, activitatea enzimei se va situa la o valoare de $51,66 \pm 1,56$ U.I., adică cu 13,9% față de valoarea minimă normală regăsită în literatura de specialitate și cea a lotului martor.

Se poate concluziona că prin administrarea unui timp mai îndelungat a unor extracte diluate de *Allium sativum*, în paralel cu o hrană îmbogățită în lipide, se constată o diminuare a activității ASAT la valori ce se situează la limitele normale citate de literatura de specialitate, pe când prin administrarea unui extract concentrat de *Allium sativum*, activitatea enzimei ASAT se diminuează cu 13,90% față de valoarea normală a acestuia.

De asemenea prin determinarea raportului De Rittis (ASAT/ALAT) s-a obținut o valoare de aproximativ 1,10 (față de valoarea normală de ASAT/ALAT =1,3 la o funcționare normală a ficatului) ceea ce denotă o afectare a funcției ficatului, atât în urma administrării suplimentare de lipide cât și a extractului de *Allium Sativum*, în special a celui concentrat.

6.4.5.3. Concluzii

- Prin administrarea de extract de *Allium Sativum*, chiar la indivizi cu hipercolesterolemie provocată se poate ajunge la o scădere a valorii colesterolului în plasmă, apropiată de valoarea normală indicată în literatura de specialitate.
- Scăderea colesterolemiei s-ar putea explica printr-o blocare a biosintezei de colesterol de către compușii cu sulf conținuți în extractul de *Allium Sativum*.

- Valorile activității alanin aminotransferazei (ALAT) la primele 3 loturi, denotă o ușoară creștere a activității enzimei ceea ce implică o activitate mai intensă a ficatului, activitate influențată în mare măsură atât de prezența unei cantități suplimentare de lipide cât și de influența extractelor de *Allium Sativum* (de existența compușilor cu sulf din extract).
- Prin administrarea unui extract concentrat de *Allium Sativum* activitatea enzimei ASAT se diminuează cu 13,90% față de valoarea normală a acesteia.
- raportul De Rittis (ASAT/ALAT) prezintă o valoare de aproximativ 1,10 ceea ce denotă o afectare a funcției ficatului atât în urma administrării suplimentare de lipide cât și a extractului de *Allium Sativum*, în special a celui concentrat.

6.5 Determinarea proprietăților de imunomodulator al extractelor naturale de *Allium sativum*

Sistemul imun și funcția imunitară realizată de acesta fac parte din schemele funcționale complexe ale organismului ce contribuie la păstrarea homeostaziei. Funcționalitatea normală de apărare imunologică constituie o condiție esențială pentru supraviețuirea organismului. Capacitatea de apărare este însă condiționată de gradul dezvoltării morfologice și funcționale a factorilor umorali și celulari care intervin în reacțiile de tip imun.

Imunomodularea implică o serie de mecanisme care vizează modelarea sistemului imun, de la caz la caz, pe o gamă largă de modalități de răspuns adaptativ la solicitările mediului extern, de la inducerea imunotoleranței și până la stimularea generală specifică și nespecifică a organismului. Descifrarea analitică a mecanismelor imunologice permite, ulterior, dezvoltarea unor tehnologii de dirijare a funcționării acestor mecanisme în sensul dorit de experimentator. S-a ajuns în acest fel la situația impresionantă a posibilităților metodologice pe care le are imunologia în prezent. Astfel, o multitudine de teste permit studierea extrem de amănunțită a sistemului imun și obținerea de date obiective, majoritatea exprimate prin valori matematice, care definesc ceea ce se numește "statusul imun" sau profilul imunologic.

Profilul imunologic reprezintă suma datelor cantitative și calitative a elementelor care fac parte din sistemul imun. Valorile, indicii și calificativele prin care se exprimă reprezintă o sinteză a elementelor definitorii a competenței imunologice, a capacității imunosistemului de a recunoaște perturbările exo- sau endogene și de a răspunde specific.

Sistemul imun este constituit din ansamblul organelor, țesuturilor, celulelor și moleculelor care participă la recunoașterea structurilor străine și la protecția organismului față de consecințele nocive ale microorganismelor. Structurile sistemului imun sunt conectate în cadrul mecanismelor care acționează permanent și răspund tuturor agenților patogeni potențiali prin elaborarea factorilor de apărare. Acești factori pot fi nespecifici,

caracteristici rezistenței naturale a organismelor, sau specifici, caracteristici răspunsului imun adaptativ.

Mecanismele nespecifice de apărare sunt realizate cu participarea complementului, properdinei, lizozimului, leucocitelor polimorfonucleare, precum și a numeroși mediatori moleculari secretați de celule.

Mecanismele specifice sunt realizate de celule și molecule implicate în răspunsul imun umoral (sinteză de anticorpi) sau celular (activare celulară).

În experimentele efectuate s-au utilizat unele substanțe imunomodulatoare care determină restructurări nespecifice ale unor efectori și mecanisme fără ca aceste modificări să poarte amprenta decisă de răspuns față de anumiți epitopi imunogeni. Substanțele imunomodulatoare activează sistemul imun de la caz la caz , pe o gamă largă de modalități de răspuns imun. Ele stimulează atât factorii umorali specifici cât și unele procese nespecifice cum ar fi fagocitoza, producerea de properdină, lizozim și complement. Acest fapt impune ca la stabilirea efectului imunogen al unui produs să se cuantifice atât factorii imuni specifici cât și cei nespecfici. Acești factori, în ansamblul lor, constituie profilul imun al organismului.

Metodologia de testare a statusului imunitar presupune în primul rând investigarea competenței funcționale a celulelor implicate în imunitate, indicator al competenței imunologice generale. Metodele de investigare vizează elementele structurale și funcționale ale limfocitelor, celulelor prezentatoare de antigen, celulelor fagocitare și ale altor celule participante la răspunsul imun care oferă informații pentru definirea profilului imunologic. În cadrul acestora, testele imunologice " convenționale " oferă date suficiente pentru evaluarea corectă a capacității de reacție a sistemului imun, deci, realizează tabloul corect al răspunsului imun.

Dintre acestea , menționăm:

- examenul morfopatologic, macroscopic și microscopic
- examenul gravimetric al organelor implicate în sistemul imun
- dozarea imunoglobulinelor
- examenul hematologic- pentru determinarea numărului de leucocite și a formulei leucocitare

- dozarea factorilor imuni nespecifici umorali

Apreciera răspunsului adaptativ și natural indus de produse antibacteriene se realizează prin determinarea profilului imunologic deoarece valorile, indicii și calificativele prin care se exprimă acesta cuprind atât componentele, cât și ansamblul efecturilor și mecanismelor imunitare.

Cercetările efectuate au urmărit caracterizarea răspunsului imun indus de produse bacteriene la 2 specii de animale : suine și bovine .

Pentru stabilirea intensității restructurărilor imunologice induse de antigenii bacterieni administrați s-au determinat următorii parametri imunologici:

- **lizozimul seric** – este o proteină cristalizabilă cu funcții de glucozidază , având acțiune litică asupra bacterilor;
- **properdina serică** – intervine în distrugerea a o serie de bacterii, a unor bacteriofagi, și are probabil, rol anticanceros; concentrația acesteia reprezintă un parametru al reactivității imunologice naturale
- **indicele fagocitar** – reprezintă un indicator al capacității fagocitare ca proces de apărare specifică și nespecifică, rezultanta acțiunii sinergice atât a elementelor celulare cât și a factorilor umorali de apărare.

Datele obținute se corelează cu rezultatele leucogramei, deoarece este posibil ca indicii scăzuți ai fagocitozei să fie datorati leucopeniei generale în cadrul căreia și numărul de fagocite să fie situat sub limitele normale.

- **leucograma**- oferă date cu privire la modificările survenite în sistemul celular de apărare ca urmare a stimulului antigenic; aceste restructurări reflectă capacitatea de răspuns specific și nespecific față de agresiunile microbiene
- **titrul de anticorpi**- confirmă importanța gammaglobulinelor în cadrul procesului de apărare la nivel umoral .

Din punct de vedere ontogenetic, răspunsul imun este dependent de gradul de maturitate morfofiziologică a organismului . În cursul proceselor de îmbătrânire, capacitatea de a produce anticorpi se micșorează, deci "memoria" imunologică se dezvoltă, se maturează și se pierde în timp.

Scopul studiului prezent constă în definirea statusului imun și a evaluării influențelor exercitate de extractul de *Allium sativum* și de determinare a eventualelor proprietăți de imunomodulator (stimulator sau supresor) al acestuia.

6.5.1. Studiul efectului imunostimulator și antitoxic a extractului de *Allium sativum*, la suine

Creșterea și exploatarea suinelor poate fi influențată în mod nefavorabil de micotoxinele secretate de unele specii de fungi prezente în furaje.

Micotoxinele acționează asupra organismului animal pe multiple căi, care nu sunt de neglijat, cele mai importante fiind cele nefrotoxice, hepatotoxice, teratogene, carcinogene, imunodepresive sau / și imunotoxice. Aceste aspecte sunt cu atât mai importante cu cât s-a dovedit că micotoxinele din organismele animale pot și ajung frecvent la consumatorul uman prin produsele obținute în urma sacrificării acestuia.

Efectele negative ale micotoxinelor sunt influențate nu numai de cantitatea ingerată ci și de perioada mai lungă de menținere a lor în diferitele structuri ale organismului animal.

Micotoxinele prezente în furaje influențează în mod negativ atât ritmul de dezvoltare corporală cât și reactivitatea imunologică a organismului , declanșând în mod frecvent boli cu o evoluție specifică.

Caracteristica generală a bolilor produse de fungii toxigeni (micotxicoze) constă în aceea că nu există mijloace terapeutice de combatere , singura măsură eficientă fiind prevenirea apariției acestor boli.

Micotoxinele generează fenomene de imunodepresie care au la bază , pe lângă modificările morfopatologice și histopatologice ale diferitelor organe și modificări ale tabloului sanguin și a capacității funcționale a efectorilor imuni umorali și celulari.

În studiul efectuat ne-am propus să studiem atât efectul imunostimulativ al extractului de *Allium sativum* la tineretul suin stimulat antigenic cu vaccinul contra agalaxiei contagioase la ovine , cât și efectul potențiator al extractului în cazul prezenței în furaje a micotoxinelor(227).

6.5.1.1. Material și metodă

Cercetările s-au efectuat pe 15 purcei în vârstă de 12 săptămâni , grupați în trei loturi experimentale:

Lotul martor (M) a fost constituit din 5 animale care au fost hrănite cu furaje de bună calitate și care au fost vaccinați subcutan (s.c.) în 2 reprize la interval de 14 zile cu câte 1 ml vaccin contra agalaxiei contagioase la ovine;

Vaccinul contra agalaxiei contagioase este un vaccin inactivat conținând antigeni de *Mycoplasma agalactiae*, produs de INMV Pasteur București.

Lotul al 2-lea (E1) a fost constituit din 5 animale hrănite cu furaje de bună calitate la care, pe lângă vaccin s-au administrat câte 2ml, s.c. , extract apos concentrat de *Allium sativum* (0.58g tiosulfinați/100 ml extract) .

La lotul al 3-lea (E2) , constituit din 5 animale hrănite cu furaje de bună calitate în care au fost adăugate micotoxine (275ml micotoxine/kg furaj) , i-au fost administrate subcutan 2ml vaccin și 2ml extract concentrat de *Allium sativum* (0.58g tiosulfinați/100 ml extract). Protocolul de administrare și recoltare a probelor de sânge e redat în tabelul 6.5.1.

Tabelul 6.5.1

Lotul	Perioada experimentală			
	inițiere	15 zile	25 zile	35 zile
M	↑ VM Proba sange	↑ VM Proba sange	— Proba sange	— Proba sange
E ₁	↑ VM+As Proba sange	↑ VM+As Proba sange	↑ Proba sange	↑ Proba sange
E ₂	↑ VM+M+As Proba sange	↑ VM+M+As Proba sange	↑ VM+M Proba sange	↑ Proba sange
.....: VM - vaccin (contra agalaxiei contagioase ovine) M - micotoxine; As- extract <i>Allium sativum</i>				

Obținerea culturii de micotoxine:

Micotoxinele utilizate s-au obținut prin cultivarea unei tulpini de *Aspergillus flavus* pe un mediu format din 5% făină de orez și 4 % făină de porumb. Mediul însămânțat s-a incubat timp de 10 zile la temperatura camerei, perioadă considerată necesară elaborării de micotoxină.

Pentru a stabili tipul de micotoxină s-a efectuat un extract eterat cu ajutorul extractorului Soxhlet. Extractul obținut după evaporarea eterului etilic , pe o baie de apă la 40° C s-a preluat cu un amestec format din cloroform și etanol (9:1).

Pentru purificare , în vederea executării cromatografiei s-a efectuat o filtrare printr-o coloană pe Silicagel. Extractul obținut s-a evaporat la se , după care s-a reluat cu 0.5 ml soluție de spălare și s-a aplicat pe plăcile de Silicagel, activate în prealabil la 105 °C.

Citirea probelor s-a făcut după dezvoltarea și uscarea plăcilor la o lampă de UV. Determinările au evidențiat că 50 ml de cultură de *Aspergillus flavus* conține 903 μg micotoxină (ochratoxină și urme de aflatoxină B1) . Prin omogenizarea a 275 ml cultură într-un kg de furaj s-a obținut furaj cu micotoxină, care s-a introdus zilnic în rația animalelor din lotul experimental E2.

Mod de lucru:

Pentru determinările de laborator s-au recoltat probe de sânge prin puncția venei jugulare la următoarele intervale : la începutul experimentului , la 15 , 25 și 35 de zile.

Probele recoltate au fost prelucrate în laborator, determinându-se următorii parametri imunologici :

- properdina - printr-o metodă preluată de la INMVB Pasteur- București , care constă în determinarea colorimetrică a properdinei izolate prin complexare pe inulină și tratarea cu reactiv biuret. Valorile s-au interpretat față de o curbă etalon stabilită în prealabil

- lizozimul- s-a determinat prin testul de difuzie simplă și radială în gel de agar față de o cultură de *Micrococcus lysodeicticus*. Diametrul haloului determinat de liza germenilor incluși în mediu este direct proporțională cu concentrația în lizozim a serului.

- leucograma - s-a determinat prin metoda May- Grunwald- Giemsa (304)

- titrul de anticorpi - s-a determinat prin testul ELISA (304)

Pentru determinarea influenței micotoxinelor asupra modului de valorificare a furajelor s-au efectuat cântăriri la începutul perioadei experimentale și la sfârșitul acesteia. Aprecierea rezultatelor s-a făcut prin calcularea sporului mediu zilnic de creștere

6.5.1.2. Rezultate și discuții

La specia suină, ca de altfel la toate mamiferele, răspunsul imun la stimulul antigenic este influențat în mare măsură de integritatea morfofuncțională a organismului. Micotoxinele ajunse accidental în organismul animal interferează sistemul imun, prin diminuarea atât a efectorilor specifici (celule imune și anticorpi) cât și a celor nespecifiți umorali (lizozim, properdină) și celulari (polimorfonucleare și mononucleare, indice fagocitar).

Datele obținute în condițiile experimentale realizate prin administrarea în hrană la tineretul suin timp de 15 zile în doze de 2.5 mg / kg furaj aflatoxine evidențiază o diminuare a rezistenței nespecifice care însă e compensată prin administrarea extractului de *Allium sativum*.

Dacă extractul de *Allium sativum* stimulează sinteza efectorilor specifici și nespecifiți la lotul de animale vaccinat la un nivel mai ridicat decât valorile înregistrate la lotul martor, acest efect se realizează și în cazul prezenței micotoxinelor.

Lizozimul seric evoluează diferit, pe parcursul perioadei experimentale, în funcție de lotul de animale. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 6.5.2 și graficul 6.5.1.

La lotul martor, valorile medii a concentrației lizozimului seric cresc progresiv atingând concentrația maximă la 25 de zile de la începutul experimentului. Această dinamică a lizozimului seric se înregistrează și la lotul de animale la care, pe lângă vaccin, s-a administrat extractul de *Allium sativum*, cu mențiunea că valorile sunt semnificativ mai mari: la 25 de zile - la lotul M s-au înregistrat $14.7 \pm 0.64 \mu\text{g/ml ser}$, la lotul E1 s-au înregistrat valori de $16.4 \pm 1.50 \mu\text{g/ml ser}$, cu 11.56% mai mari decât cele ale lotului martor, pentru că la lotul al 3-lea, E2, în prima parte a experimentului, valorile medii ale concentrației lizozimului seric se mențin la valori similare cu cele înregistrate la lotul M și respectiv la lotul E1, dar în partea a 2-a a experimentului acestea sunt mai mici decât cele înregistrate atât la lotul M cât și la lotul E1.

Valorile medii ale lizozimului seric, $\mu\text{g/ml ser.}$

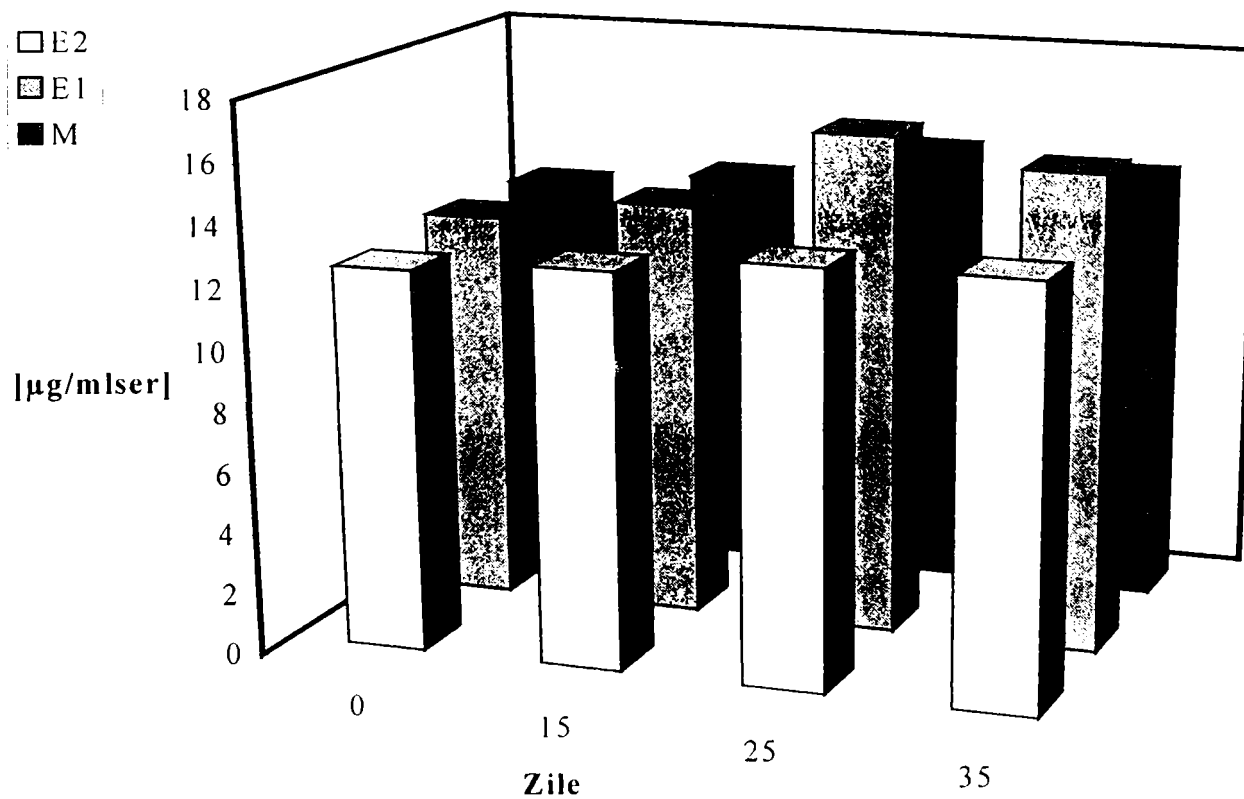
Tabelul 6.5.2

Lot	Indivizi	Rezultate	Perioada experiment			
			Inițial	15 zile	25 zile	35 zile
M	5	$x \pm Sx$	12,8 \pm 0,71	13,4 \pm 0,75	14,7 \pm 0,64	14,2 \pm 0,73
		C.U.	5,56	5,64	4,35	5,14
E ₁	5	$x \pm Sx$	12,9 \pm 0,89	13,7 \pm 1,12	16,4 \pm 1,5	15,6 \pm 2,4
		C.U.	6,90	8,17	9,15	15,38
E ₂	5	$x \pm Sx$	12,5 \pm 0,76	12,9 \pm 2,4	13,5 \pm 0,86	13,6 \pm 3,1
		C.U.	6,08	18,60	6,37	22,79

Legenda: M – martor; E₁ – vaccinat + AS; E₂ –vaccinat + AS + micotoxine

Graficul 6.5.1.

Valorile medii ale lizozimului seric la suine



Această evoluție a lizozimului seric , se înregistrează și la lotul E2, ceea ce relevă faptul că extractul de *Allium sativum* potențează în măsură mai redusă sinteza acestui parametru imunologic în prezența micotoxinelor.

Rezultatele obținute evidențiază efectul cumulativ al micotoxinelor asupra sintezei de lizozim seric.

Properdina serică , ca factor principal al rezistenței nespecifice , prezintă o evoluție caracteristică la cele trei loturi, pe toată perioada experimentului, așa cum este reprezentată în tabelul 6.5.3 și graficul 6.5.2.

Dacă la începutul experimentului nu se constată diferențe semnificative, valorile medii ale properdinei fiind sensibil egale și fără variații individuale (coeficientul de variație C.V. este mai mic de 10%) , după a 2-a administrare a extractului de *Allium sativum* apar diferențe semnificative care se mențin până la sfârșitul perioadei experimentale.

Astfel , la 25 de zile de la începutul experimentului , valorile medii ale properdinei serice la lotul martor M sunt mai mici decât la lotul E1 (18.9 ± 1.04 mg% ml ser) , față de 23.0 ± 2.9 mg % ml ser, diferență care se păstrează și la sfârșitul experimentului. Aceste date evidențiază efectul stimulatv al extractului de *Allium sativum* asupra sintezei de properdină serică.

La lotul E2 , la care pe lângă vaccin și *Allium sativum* s-au administrat și micotoxine, valorile medii , în prima parte a perioadei experimentale sunt similare cu cele înregistrate la lotul martor și E1 , dar în partea a 2-a, ele sunt mai mici decât la lotul E1 dar mai mari decât la lotul martor.

Acest aspect relevă că extractul de *Allium sativum* inhibă efectul imunotoxic al micotoxinelor.

Menționăm însă că în cazul properdinei serice, valorile individuale prezintă o variație mare (C.V.- 16.2 %) , ceea ce dovedește o reactivitate imunologică diferită a animalelor față de extractul de *Allium sativum* în prezența micotoxinelor.

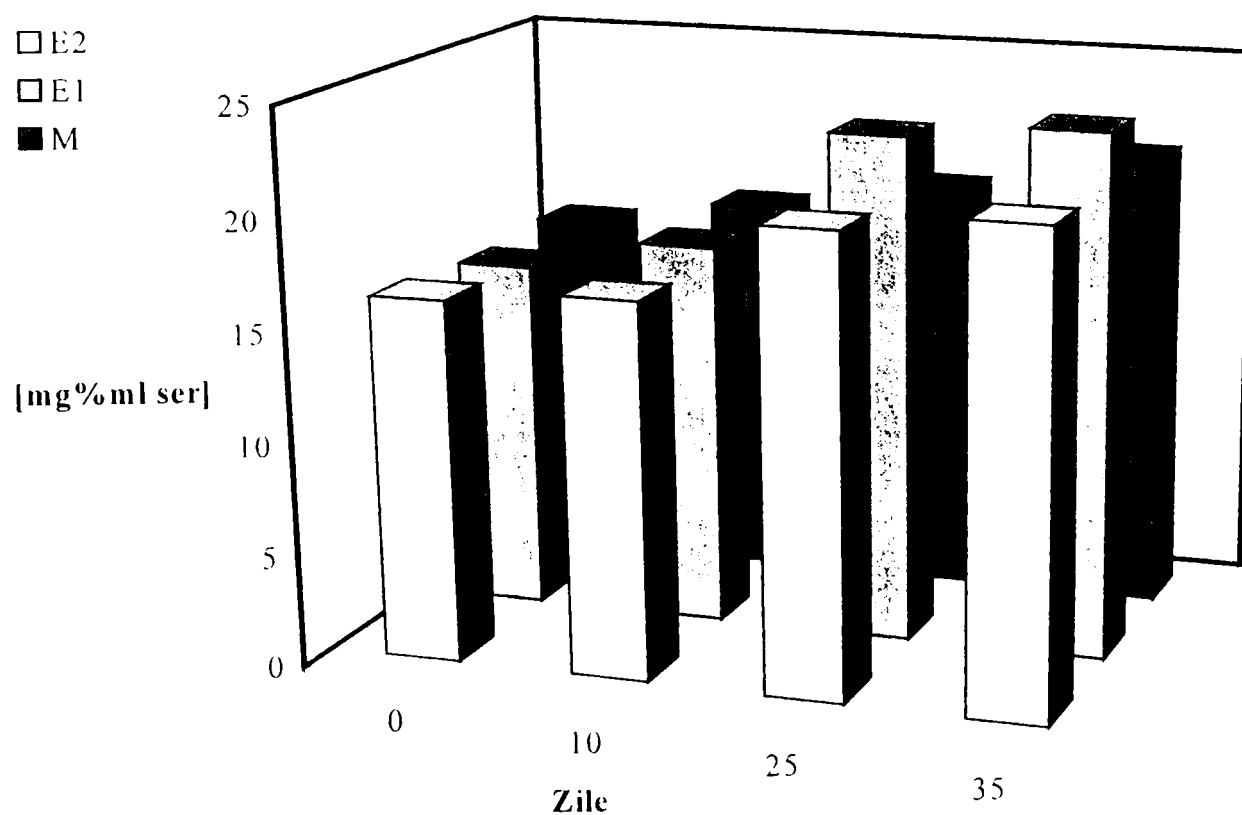
Valorile medii ale proferdinei serice (mg%mlser)

Tabelul 6.5.3

Lotul	Nr. indivizi	Speci- ficare	Perioada experimentală			
			Inițial	La 10 zile	La 25 zile	La 35 zile
M	5	$\bar{x} \pm S_x$	16,2±0,98	17,5±1,22	18,9±1,04	20,9±1,96
		C.U.	6,06	6,99	5,30	9,40
E ₁	5	$\bar{x} \pm S_x$	15,9±0,95	17,4±1,3	23,0±2,9	23,7±1,1
		C.U.	7,33	7,47	12,61	4,64
E ₂	5	$\bar{x} \pm S_x$	16,3±1,10	16,9±2,1	20,6±3,3	21,4±3,0
		C.U.	6,75	12,43	16,02	14,02

Graficul 6.5.2.

Valorile medii ale proferdinei serice la suine



Indicele fagocitar . Fagocitoza, ca proces de apărare specifică și nespecifică este rezultanta acțiunii sinergice atât a elementelor celulare cât și a factorilor umorali nespecifici de apărare. Datele obținute evidențiază o dinamică similară a indicelui fagocitar cu cea a properdinei serice, ceea ce se prezintă și în tabelul 6.5.4 și în graficul 6.5.3.

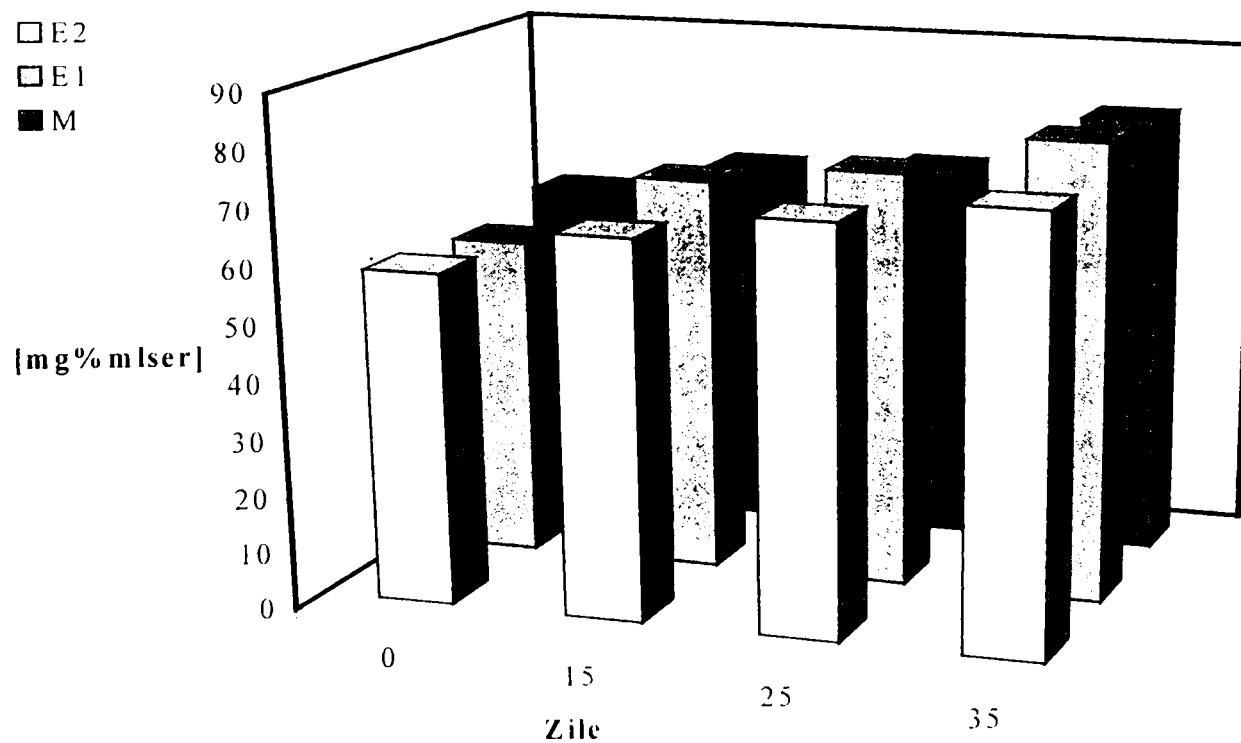
Valorile medii ale indicelui fagocitar la suine

Tabelul 6.5.4

Lotul	Nr. indivizi	Speci- ficare	Perioada experimentală			
			Inițial	La 15 zile	La 25 zile	La 35 zile
M	5	$\bar{x} \pm S_x$	60,1 \pm 2,3	66,3 \pm 4,2	67,9 \pm 2,3	78,9 \pm 3,2
		C.U.	3,83	6,33	3,39	4,05
E ₁	5	$\bar{x} \pm S_x$	57,0 \pm 1,1	70,1 \pm 2,3	73,5 \pm 5,2	80,8 \pm 2,4
		C.U.	2,37	3,28	6,54	2,97
E ₂	5	$\bar{x} \pm S_x$	58,6 \pm 3,2	66,7 \pm 3,9	71,5 \pm 9,1	75,6 \pm 8,2
		C.U.	5,46	5,84	12,73	10,85

Graficul 6.5.3.

Valorile medii ale indicelui fagocitar la suine



Valorile cele mai ridicate s-au înregistrat la lotul la care pe lângă vaccin s-a administrat și extractul de *Allium sativum*.

La lotul E2 (la care s-au adăugat și micotoxinele) efectul extractului de *Allium sativum* asupra indicelui fagocitar se manifestă numai în a 25-a zi a perioadei experimentale, înregistrând o valoare de 71.5 ± 4.1 % față de 67.9 ± 2.3 %, la lotul martor. La sfârșitul perioadei experimentale, ca urmare a efectelor toxice cumulative a micotoxinelor valoarea indicelui fagocitar este mai mică decât la celelalte loturi. Și în acest caz se constată o variabilitate mare individuală.

Leucograma , test care evidențiază modificările survenite în tabloul sanguin și în mod special , în cazul unor stimuli antigenici, redă efectul stimulat al extractului de *Allium sativum* asupra celulelor implicate în răspunsul imun specific și nespecific. Evoluția datelor obținute prin leucogramă este similară cu a indicelui fagocitar și cu titrul de anticorpi specifici anti *Mycoplasma agalactiae*, după cum sunt prezentate în tabelul 6.5.5. și graficul 6.5.4.

Dacă în cazul leucocitelor totale nu se constată diferențe semnificative între eșantioanele recoltate de la cele 3 loturi de animale, diferențele apar însă în evoluția limfocitelor (celulele imunocompetente).

La lotul stimulat numai cu vaccin (lotul martor) , limfocitele cresc progresiv până la sfârșitul experimentului când se înregistrează valoarea maximă de 50.8 ± 1.2 % din leucocitele totale. La lotul la care , pe lângă vaccin s-a administrat și extract de *Allium sativum* (lotul E1) dinamica este asemănătoare dar raportul neutrofile/ limfocite se inversează în a 25-a zi a perioadei experimentale. Acest fapt denotă că extractul de *Allium sativum* stimulează procesul de citodiferențiere a limfocitelor. La lotul la care extractul de *Allium sativum* a fost administrat în prezența micotoxinelor (E2) limfocitele scad pe parcursul perioadei experimentale cu o ușoară creștere la sfârșitul experimentului. Această dinamică evidențiază efectul citotoxic al micotoxinelor.

Efectul imunostimulativ al extractului de *Allium sativum* se manifestă numai la concentrații mici de micotoxine, aspect care rezultă din datele obținute la 15 zile de la începutul perioadei experimentale.

Valorile medii ale elementelor afectate , din formula leucocitară, la suine vaccinate cu vaccin contra agalaxiei contagioase ovine, tratate cu extract de *Allium sativum* și hrănite cu furaje cu micotoxine

Tabelul 6.5.5.

	Unități							
	ES	ES	ES	ES	ES	ES	ES	ES
leucocite /mm ³	8840.2± 506	5.72	9046.1± 477	5.27	10207.0± 410	4.01	10530± 527	5.00
neutrofile %	58.0±0.7	1.20	56.8±0.6	1.05	50.6±0.7	1.38	44.3±1.1	2.48
linfocite %	36.0±0.6	1.66	37.2±0.5	1.34	43.4±0.6	1.38	50.8±1.2	2.36
leucocite /mm ³	9382.0± 678	7.22	10400.0± 931	8.95	9800.0± 840	8.57	10680± 489	4.57
neutrofile %	57.9±0.9	1.55	52.7±0.5	0.94	37.9±1.2	3.16	32.4±0.8	2.46
linfocite %	36.8±0.7	1.90	32.5±0.4	1.23	48.3±0.7	1.41	54.9±0.6	1.09
leucocite /mm ³	8928.5± 793	8.88	9385± 662	7.05	7700.0± 594	7.71	7671.4± 217	2.83
neutrofile %	59.8±0.8	0.74	59.8±0.5	0.83	59.6±0.9	1.51	58.6±0.6	1.02
linfocite %	37.4±0.7	1.87	33.2±0.4	1.20	32.6±0.7	2.14	39.1±0.6	1.53

Unde M: lot martor vaccinat;

E1: lot experimental vaccinat+extract de *Allium sativum*;

E2: lot experimental + extract *Allium sativum* + micotoxine

Astfel, valorile medii ale limfocitelor sunt aproximativ egale (la 15 zile) cu cele înregistrate la lotul martor și la lotul experimental E1.

În consecință micotoxinele determină fenomene de imunodepresie acționând fie prin blocarea evenimentelor celulare și moleculare ce compun inducția răspunsului imun, fie pe cele ce formează expresia răspunsului imun.

Titrul de anticopi antiMycoplasma . Analizând rezultatele obținute cu privire la răspunsul imun specific determinat prin testul ELISA , se constată că extractul de Allium sativum stimulează sinteza de anticorpi atât atunci când este administrat ca un adjuvant vaccinal cât și în prezența micotoxinelor.

Astfel , dacă la animalele din lotul martor vaccinat, titrul de anticorpi crește progresiv pe perioada experimentului, la animalele din lotul E1 , creșteri semnificative se înregistrează încă după prima administrare (tabelul 6.5.6.). Valoarea semnificativ crescută a titrului de anticorpi în răspunsul imun primar , relevă că extractul de Allium sativum poate fi administrat numai o singură dată în stimularea răspunsului imun post vaccinal. Valoarea maximă a titrului de anticorpi DO (105.8 ± 3.87) ce se înregistrează la sfârșitul perioadei experimentale este cu 63.2 % mai mare față de lotul martor vaccinat.

Efectul imunoreglator al extractului de Allium sativum se manifestă și în cazul prezenței micotoxinelor, dar mai tardiv , numai în partea a 2-a a perioadei experimentale. Astfel în a 25-a zi a experimentului, titrul de anticorpi înregistrat este semnificativ mai mare decât a martorului (47.3 ± 1.87 DO față de 34.0 ± 2.23 DO) dar este mai mic decât cel înregistrat la în cazul lotului E1.

Extractul de Allium sativum pe lângă efectul imunostimulator , influențează pozitiv și valorificarea hranei de către animal, aspect care reiese din sporul mediu zilnic realizat la animalele din lotul E1 (Tabelul 6.5.7.)

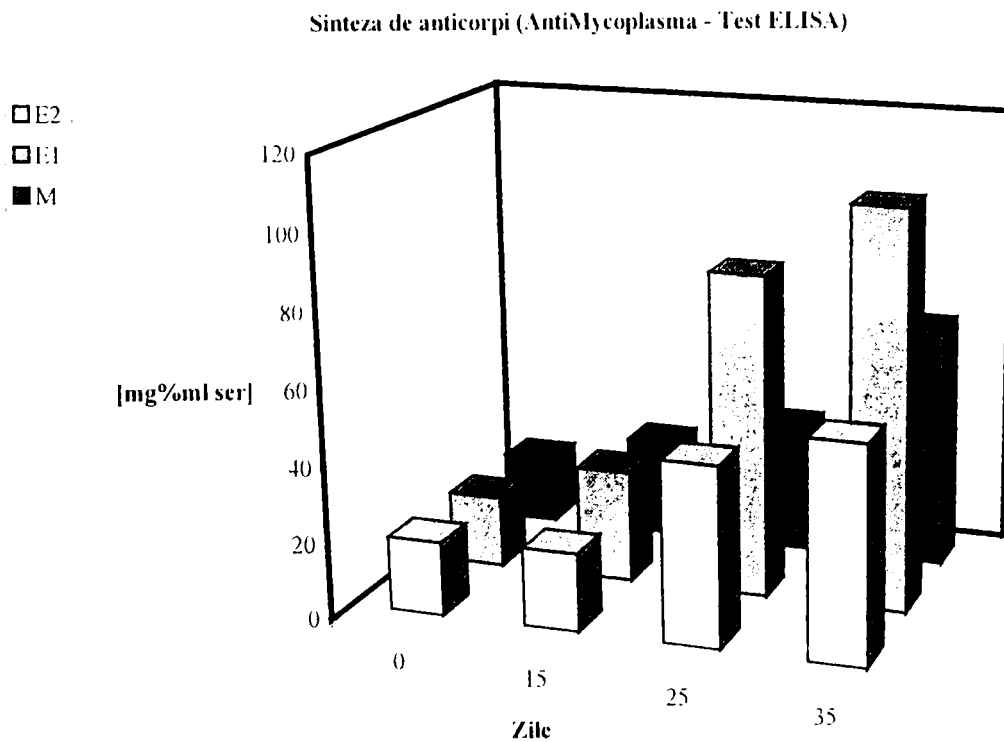
Dacă la animalele din lotul martor sporul mediu zilnic a fost de 0.378 g / zi , animalele din lotul E1 au înregistrat un spor de 0.488g/zi cu o creștere de 29.1 % față de lotul martor.

Sinteza de anticorpi (AntiMycoplasma - test ELISA) la suine

Tabelul 6.5.6.

Lotul	Nr. indivizi	Titrul de anticorpi (DO)	Perioada experimentală			
			Inițial	La 15 zile	La 25 zile	La 35 zile
M	5	$x \pm Sx$	17,7 \pm 0,80	25,9 \pm 1,38	34,0 \pm 2,23	64,8 \pm 4,73
		C.U.	4,52	5,33	6,56	7,30
E ₁	5	$x \pm Sx$	18,8 \pm 1,10	29,6 \pm 1,12	85,7 \pm 1,92	105,8 \pm 3,87
		C.U.	5,85	3,78	2,24	6,83
E ₂	5	$x \pm Sx$	19,5 \pm 0,93	20,7 \pm 1,26	47,3 \pm 1,87	56,6 \pm 2,60
		C.U.	4,77	6,09	3,95	4,59

Graficul 6.5.4.



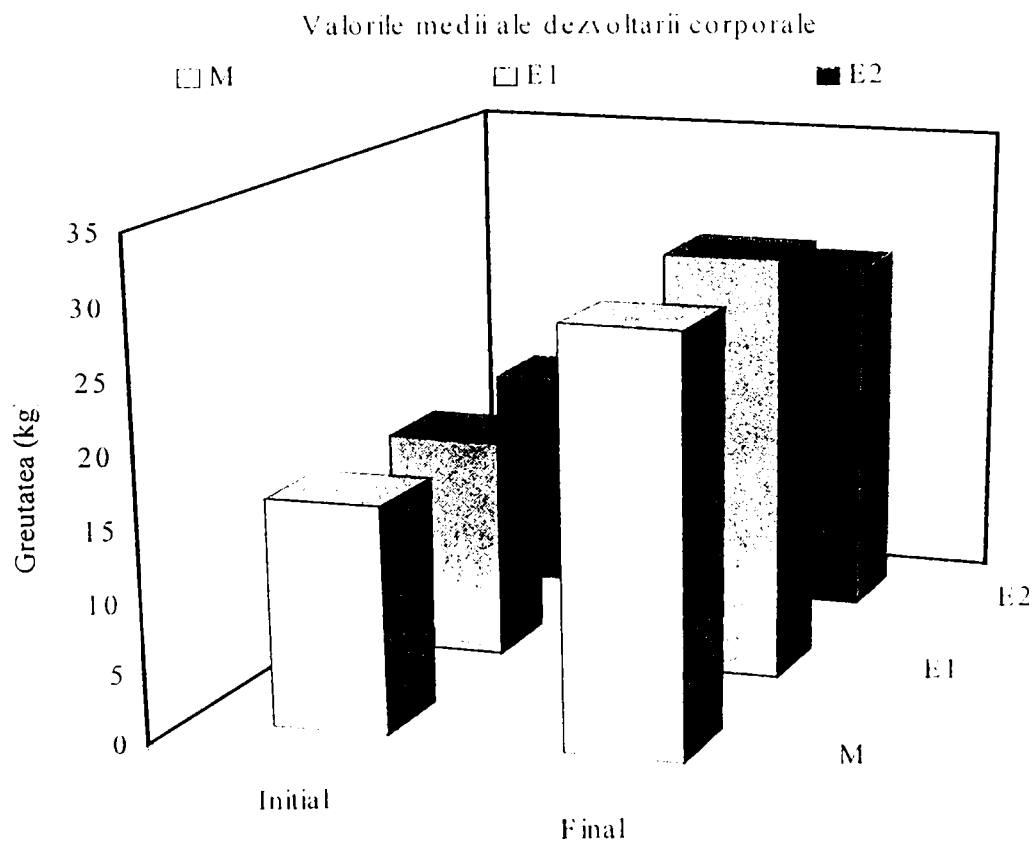
Efectul benefic al extractului de *Allium sativum* asupra dezvoltării corporale ale animalelor se reflectă și în cazul prezenței micotoxinelor, sporul mediu zilnic înregistrat la animalele din lotul E2 fiind de 0.337g/zi față de 0.378g/zi la animalele din lotul martor.

Valori medii ale dezvoltării corporale la suine

Tabelul 6.5.7.

Lotul	Nr. animale	Specific	Greutatea (kg)		Spor mediu zilnic (gr)
			Inițial	Final	
M	5	$\bar{x} \pm S_x$	16,16 \pm 0,78	29,40 \pm 1,28	0,378 \pm 0,02
		C.U.	4,87	4,37	5,76
E ₁	5	$\bar{x} \pm S_x$	15,88 \pm 0,79	30,51 \pm 1,25	0,488 \pm 0,06
		C.U.	4,99	4,10	12,29
E ₂	5	$\bar{x} \pm S_x$	16,20 \pm 0,88	26,32 \pm 1,06	0,337 \pm 0,09
		C.U.	5,49	4,03	26,70

Graficul 6.5.5.



6.5.1.3 Concluzii

- Extractul de *Allium sativum* stimulează sinteza efectorilor specifici și nespecifici la un nivel mai ridicat decât valorile înregistrate la lotul martor, atât la lotul de animale vaccinat cât și în cazul lotului cărui a i s-au administrat și micotoxine;

- Se evidențiază efectul stimulatив al extractului de *Allium sativum* asupra sintezei de properdină serică: extractul de *Allium sativum* inhibă efectul imunotoxic al micotoxinelor.

- Extractul de *Allium sativum* potențează în măsură mai redusă sinteza lizozimului seric în prezența micotoxinelor.

Rezultatele obținute evidențiază efectul cumulativ al micotoxinelor asupra sintezei de lizozim seric.

- Extractul de *Allium sativum* inhibă efectul imunotoxic al micotoxinelor.

- La sfârșitul perioadei experimentale, ca urmare a efectelor toxice cumulative a micotoxinelor valoarea indicelui fagocitar la sfârșitul perioadei experimentale este mai mică decât la celelalte loturi

- Extractul de *Allium sativum* stimulează procesul de citoformare a limfocitelor

- Efectul imunostimulativ al extractului de *Allium sativum* se manifestă numai la concentrații mici de micotoxine

- Valoarea semnificativ crescută a titrului de anticorpi antiMycoplasma în răspunsul imun primar , relevă că extractul de *Allium sativum* poate fi administrat numai o singură dată în scopul stimulării răspunsului imun .

- La sfârșitul experimentului, titrul de anticorpi înregistrat este semnificativ mai mare decât a martorului (47.3 ± 1.87 DO față de 34.0 ± 2.23 DO) dar este mai mic decât cel înregistrat la în cazul lotului E1.

- Extractul de *Allium sativum* pe lângă efectul imunostimulator , influențează pozitiv și valorificarea hranei de către animal;

- La lotul martor, sporul mediu zilnic a fost de 0.378 g / zi , animalele din lotul E1 au înregistrat un spor de 0.488g/zi cu o creștere de 29.1 % ;

- Efectul benefic al extractului de *Allium sativum* asupra dezvoltării corporale a animalelor se reflectă și în cazul prezenței micotoxinelor, sporul mediu zilnic înregistrat

la animalele din lotul E2 fiind de 0.337g/zi față de 0.378g/zi la animalele din lotul martor.

6.5.2. Studiul efectului imunostimulator a extractului de *Allium sativum* , la bovine

Afecțiunile sistemului imun caracterizate prin reducerea semnificativă a funcțiilor sale de recunoaștere și de elaborare a răspunsului pot fi remediate prin utilizarea unor substanțe imunomodulatoare. Datorită acestui fapt, stimularea pe căi nespecifice a factorilor imunologici de apărare a organismului, reprezintă alături de alte măsuri un mijloc de reducere a morbidității și a pierderilor de animale.

Produsele vegetale reprezintă o sursă inepuizabilă de preparate cu proprietăți imunomodulatoare.

Unul din multitudinea acestora îl reprezintă și extractul de *Allium sativum*.

Din aceste considerente studiul nostru s-a axat și pe determinarea efectului imunomodulator la tineretul taurin stimulat cu un antigen reprezentat de vaccinul antisalmonelic , produs de INMVB Pasteur, București.

6.5.2.1. Material și metodă:

Cercetările s-au efectuat pe 30 de animale (tineret bovin îngrășat) în vârstă de 7-8 luni, grupate în 2 loturi a câte 15 animale:

- un lot martor (M)- vaccinat sub cutan-s.c cu câte 5 ml în două reprize, la interval de 15 zile

-un lot experimental E1 - la care , concomitent cu vaccinarea, s-a administrat , în puncte separate, 2 ml de extract apos de *Allium sativum* (0.58g /100ml extract) .

Pentru evaluarea efectului imunostimulator al extractului de *Allium sativum* , s-au recoltat probe de sânge prin puncția venei jugulare, la începutul experimentului, la 14 și la 21 de zile, și s-au determinat următorii parametri : lizozimul seric, properdina, indicele fagocitar, formula leucocitară și titrul de anticorpi.

6.5.2.2. Rezultate și discuții:

Analizând datele obținute pe parcursul perioadei experimentale , cu privire la valorile medii ale parametrilor imunologici luați în studiu, se constată diferențe semnificative de la un lot la altul.

Properdina și lizozimul seric ca factori umorali nespecifici, sunt stimulați de extractul de *Allium sativum* (tabelul 6.5.8. și graficul 6.5.6)

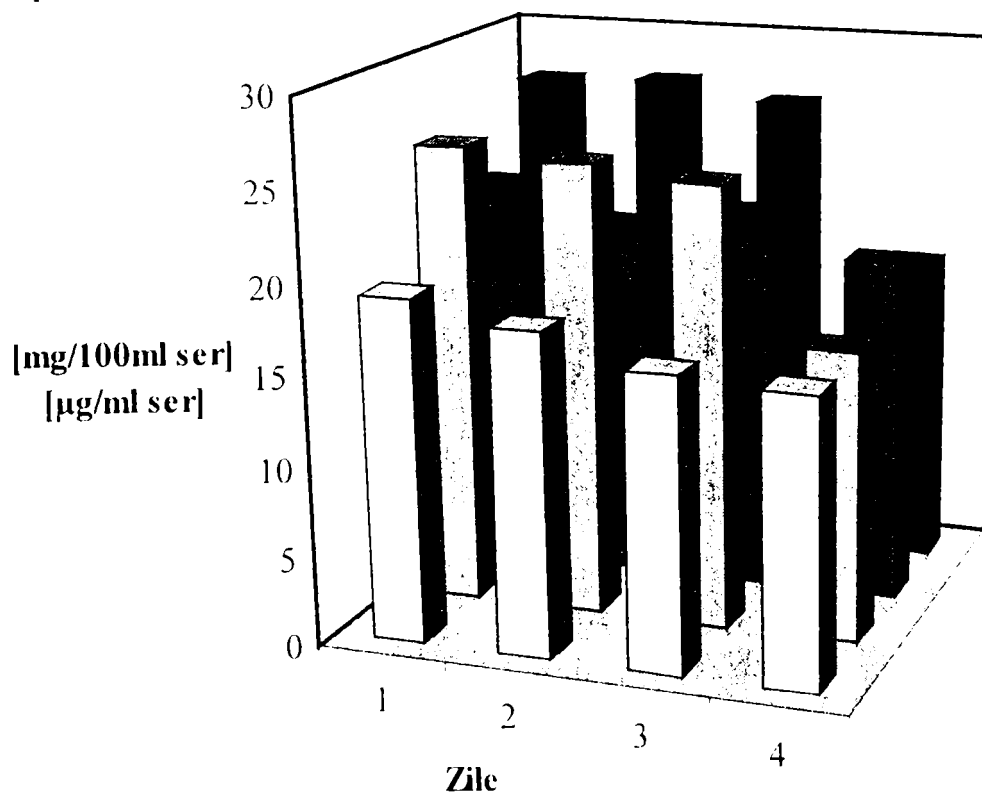
Tabelul 6.5.8

Parametrul	Lot	Perioda experimentală (zile)			
		0	7	14	21
Properdină mg% ml ser	M	19.3±0.7	21.5±2.2	20.4±1.5	22.2±0.8
	E	17.5±0.4	26.4±1.5	27.3±1.5	27.0±1.8
Lizozim μg/ml ser	M	15.9±0.6	16.3±0.9	18.0±1.8	19.2±1.1
	E	16.2±0.8	24.7±1.1	25.3±1.2	25.8±0.7
Indice fagocitar	M	64.4±1.3	67.6±10.6	69.5±9.6	78.6±2.6
	E	66.8±5.0	67.5±6.4	77.8±4.2	78.8±3.1

Graficul 6.5.6.

Valorile properdinei și lizozimului seric la tineretul taurin

- Lizozim μg/ml ser M Lizozim μg/ml ser E
 Properdina mg/100ml ser M Properdina mg/100ml ser E



Valori semnificative mai ridicate față de lotul martor se înregistrează încă după prima administrare (properdina : 21.5 ± 2.2 mg % la 26.4 ± 1.88 mg % iar lizozimul de la 16.3 ± 0.9 la 24.7 ± 1.1 μ g %). Această creștere a sintezei factorilor umorali se menține pe toată durata experimentului cu valori maxime la sfârșitul acestuia .

Indicele fagocitar ca expresie a procesului de fagocitoză prezintă valori semnificativ mai mari la lotul stimulat cu *Allium sativum* numai după prima administrare, ca la sfârșitul perioadei experimentale valorile să fie semnificativ apropiate între cele două loturi (tabelul 6.5.8 și graficul 6.5.6.). Acest fapt evidențiază faptul că extractul de *Allium sativum* are o acțiune mai moderată asupra granulocitelor implicate în apărarea nespecifică.

Dinamica indicelui fagocitar pe parcursul perioadei experimentului la lotul de animale stimulat cu extract de *Allium sativum* , se corelează cu datele obținute din leucogramă (tabelul 6.5.9).

Efectul mai moderat al extractului de *Allium sativum* asupra elementelor celulare , rezidă și din faptul că raportul neutrofile/limfocite se inversează după 14 zile de la administrarea imunostimulatorului.

Activarea celulelor implicate în receptarea și prelucrarea antigenilor indusă de extractul de *Allium sativum* se exprimă și prin modificări cantitative și calitative a formulei leucocitare. Astfel se constată o creștere progresivă a leucocitelor totale, iar în cadrul lor a limfocitelor (tabelul 6.5.9)

Faptul că raportul dintre neutrofile și limfocite se inversează în favoarea limfocitelor relevă că produsul prezintă un bun efect de potențare a răspunsului imun specific.

Acest efect se exprimă și printr-un titru de anticorpi mai mare la lotul căruia i s-a administrat pe lângă vaccin și extract de *Allium sativum* (tabelul 6.5.9).

Formula leucocitară și indicele fagocitar la tineretul taurin

Tabelul 6.5.9..

Parametru	Lot	10 ⁶ /mm ³	Indicele fagocitar	10 ⁶ /mm ³	10 ⁶ /mm ³
Leucocite mm ³	M	5.680±328	5440±224	7040±892	7660±828
	E	5590±349	5630±256	7430±547	7860±559
Neutrofile %	M	58.2±0.6	56.5±0.4	50.6±0.7	44.3±1.1
	E	57.2±0.6	55.1±0.8	46.4±0.9	38.8±1.4
Linfocite %	M	36.0±0.7	37.3±0.5	43.4±0.6	50.5±1.2
	E	37.3±0.5	39.5±0.7	48.2±1.2	55.7±1.3
Indicele fagocitar (OO)	M	0	1111.8	1112.6	1120.8
	E	0	1210.6	1221.8	1237.8

Creșteri semnificative ale titrului de anticorpi față de lotul martor se înregistrează în cadrul răspunsului imun primar (după prima administrare) și se menține constant pe toată durata perioadei experimentale .

Această dinamică evidențiază că extractul de *Allium sativum* nu necesită administrarea de rapel pentru a-și manifesta efectul imunostimulator asupra sintezei de anticorpi.

6.5.2.3. Concluzii

- Properdina și lizozimul seric ca factori umorali nespecifici, sunt stimulați de extractul de *Allium sativum*
- Indicele fagocitar prezintă valori semnificativ mai mari la lotul stimulat cu *Allium sativum* numai după prima administrare;
- Extractul de *Allium sativum* are o acțiune mai moderată asupra elementelor celulare, raportul neutrofile/ limfocite se inversează după 14 zile de la administrare.
- Stimulează mai intens sinteza factorilor umorali de apărare și are o acțiune moderată asupra factorilor celulari ;
- Rezultatele obținute pledează pentru utilizarea extractului de *Allium sativum* în potențarea vaccinurilor cu o imunogenitate mai scăzută.

CONCLUZII

- Principalii bioconstituenți ai *Allium sativum* autohton se situează la valori similare cu a altor specii de *Allium sativum*; aceștia nu sunt esențial influențați de condițiile pedoclimatice
- Mineralele se situează la valori apropiate de cele reprezentate în literatura de specialitate; s-au determinat concentrații ușor crescute ale calciului (62 ± 0.5 mg %) și respectiv 480 ± 23 mg% ale fosforului față de valorile indicate de literatura de specialitate pentru aceste elemente ; de asemenea seleniul , se situează la valori de 10-15 μg % , cu 15 % mai ridicate față de valorile întâlnite în literatură; restul valorilor microelementelor determinate se situează la valori apropiate de a celor din literatura de specialitate (56).
- Cantitatea de compuși biologic activi se reduce considerabil la extractul obținut prin distilare uscată, în urma menținerii timp de 30 zile a extractului la temperatura camerei (de la 1.84 ± 0.21 μmoli tiosulfinați/ 100ml extract la o cantitate nedetectabilă prin metoda fotocolorimetrică) și la aproximativ 1/5 din valoarea inițială (de la 3.30 ± 0.12 μmoli tiosulfinați/ 100ml extract la 0.47 ± 0.20), după 30 de zile de stocare la temperatura de 4°C.
- Tiosulfinații suferă o depreciere aproape insesizabilă la extractul apos condiționat cu glicerină și menținut la temperatura de 4°C.
- Se observă în acest fel o influență semnificativă , atât a modului de obținere a extractului cât și a condiționării acestuia; rezultate superioare în menținerea principiilor activi ai extractului se pot realiza prin stocarea extractului apos la temperaturi de 4°C, cu 10% adaos de glicerină ca stabilizator.

Concluziile ce se desprind în urma sintezei S-alchil-L-cisteinei și a S-alchil L-cisteinsulfoxizilor sunt următoarele:

- **Sinteza S-alchil-L-cisteinelor** decurge cu randamente de aproximativ 50 %, respectând următoarele condiții de reacție:
 - mediu de reacție alcoolic, pH slab acid (pH=5);
 - temperatura , factor decisiv în obținerea produșilor S-alchil-L(+)-cisteinelor, este necesar să fie menținută la valori sub 50 °C
 - necesitatea menținerii unui exces de halogenură de alchil față de cisteină

- S-alchil-L(+)-cisteinelor se prezintă , în marea lor majoritate, ca pulberi albe sau alb-gălbui ; au p.t. cuprinse între 206-242 °C apropiate de cele rediate în literatură
- analiza elementală a S-alchil-cisteinelor indică valori determinate conforme cu valorile calculate, în limitele erorilor experimentale
- spectrele IR relevă existența benzilor caracteristice ionilor COO^- , NH_3^+ (corespunzătoare benzii I și benzii II a aminoacizilor) precum și benzile ce indică prezența grupelor alchil
- prezența grupelor alchil este confirmată și prin analizele H-RMN
 - **Sinteza S-alchil-L(+)-cisteinsulfoxizilor** se realizează respectând următoarele condiții de reacție :
 - mediul de reacție este apos acidulat, cu pH = 4.5-5.5 realizat cu acid acetic, menținerea unui mic exces de H_2O_2 30% față de alchilcisteină, temperatura de reacție maxim de 25 °C; randamentele se situează la valori cuprinse între 41 – 56 %
 - aspectul produșilor de reacție este a unor pulberi albe mătăsoase, cu p.t. mai scăzute decât a precursorilor lor (150-168 °C)
 - analiza elementală a S-alchil-cisteinelor indică valori determinate apropiate de valorile calculate
 - spectrele IR relevă existența benzilor caracteristice grupărilor COO^- , NH_3^+ (corespunzătoare benzii I și benzii II a aminoacizilor) precum și a benzilor ce indică prezența grupelor alchil și cele caracteristice sulfoxizilor
 - oxidarea sulfului este confirmată și prin analiza RMN

Concluziile ce derivă din studiul enzimei cheie a speciei de *Allium sativum* autohton sunt următoarele:

- Masa moleculară a enzimei este de 83.000, valoare apropiată de cea dată în literatura de specialitate: 85.000
- Valorile obținute ale constantei Michaelis(K_m) arată ordinea afinității față de substrat. Cea mai mare afinitate se regăsește la sulfoxidul S-etil L-(+)-cisteinei ($K_m=3.40$), urmat de sulfoxidul S-propil-L-(+)-cisteinei ($K_m=4.20$), sulfoxidul S-alil-L-(+)-cisteinei ($K_m=6.60$) și sulfoxidul S- metil-L-(+)-cisteinei ($K_m=12.0$);
- Tipul de inhibare pentru substratele luate în lucru s-a stabilit prin reprezentarea Lineweaver-Burk; se sugerează prezența unei inhibări

competitive între S-alchil-L-(+)-cisteine , L-cisteină și substrat , înregistrându-se scăderi ale afinității enzimei față de sustrat cu 27-56.6 %) ;

- L(+)-cisteina manifestă în cazul S-propil-L-(+)-cistein sulfoxidul o diminuare a vitezei de reacție cu 56.6%, se înregistrează o constantă de inhibiție $K_i = 0.76$; în cazul S-metil-L-(+)-cistein sulfoxidului se înregistrează o valoare $K_i=0.83$, ceea ce reprezintă o creștere a constantei Michaelis de la 12.10 la 26.3, adică cu 54.1%.
- În cazul S-metil-L-(+)-cisteinei inhibiția se manifestă astfel: o creștere de 39.5% ($K_m'=20$ față de $K_m=12.10$) în cazul S-metil-L-(+)-cistein sulfoxidul, respectiv se înregistrează o constantă de inhibiție $K_i=1.5$; valori similare se înregistrează și în cazul S-propil-L-(+)-cistein sulfoxidului. Se remarcă o afectare mai puțin intensă în cazul afinității față de S-alil L-(+)-cistein sulfoxid și de S-etil-L-(+)-cistein sulfoxid;
- Efectul de inhibare competitivă se realizează mai pregnant în cazul L-(+)-cisteinei , ceea ce implică o competitivitate structurală față de situsul catalitic al alinazei;
- Acidul ascorbic acționează ca activator al enzimei , înregistrându-se creșteri ale afinității enzimei față de sulfoxidul S-alchil-L-(+)-cisteinei cu 25.7-44.5 %.

Extractele de Allium sativum obținute au fost testate în vederea activităților lor biologice. Astfel în urma studiului efectuat pentru determinarea caracterului bactericid și bacteriostatic s-au concluzionat următoarele:

- Concentrația minimă inhibantă (CMI) și concentrația minimă bactericidă (CMB) se înregistrează la **extractul apos stabilizat cu glicerină 10%** , la diluții de 1/80 în bulion , față de Salmonella, Proteus și Streptococ și la diluții de 1/40 față de E.coli și Stafilococ .
- Extractul apos de Allium sativum cu o concentrație de 0.58g % tiosulfinați are un efect similar cu cel al extractului obținut prin distilare uscată, în mediu de gaz inert, la 80-120°C și un vid de 25 mmcol.Hg
- Efectul S-alchil-L-cisteinsulfoxizilor obținuți sintetic este mai slab comparativ cu al extractelor naturale
- Efectele superioare ale extractelor față de cele ale S-alchil-L-cisteinsulfoxizilor sintetizați s-ar putea datora efectelor combinate cu a

- Efectele superioare ale extractelor față de cele ale S-alchil-L-cisteinsulfoxizilor sintetizați s-ar putea datora efectelor combinate cu a celorlalți compuși cu sulf existenți în extractul de *Allium sativum*, care ar putea avea efecte de potențare a activității bactericide a extractului. Producții naturali ar putea acționa prin intermediul tiosulfinaților și a altor compuși cu sulf la nivelul grupărilor SH reactive din membranele celulare ale unor microorganisme

În urma studiului efectului antimicotic s-au putut releva următoarele:

- Extractul pur are un efect antimicotic de 100 % asupra tulpinilor de *Penicillium*, *Cladosporium* și *Aspergillus*;
- Un efect mai moderat o prezintă diluțiile crescânde ale extractului, pentru ca la diluții mai mari de 10^{-3} , efectul să dispară total.

În ceea ce privește utilizarea extractului de *Allium sativum* în vederea decontaminării aerului s-au putut concluziona următoarele:

- Extractul de *Allium sativum* se poate utiliza la decontaminarea aerului în incinte infestate cu *Escherichia coli*, în concentrații de 2.5-5%, cu efecte mai bune chiar și decât produsul german Elorisan sau a binecunoscutului produs Septosol.
- Rezultatele bune obținute de extractul de *Allium sativum* în decontaminarea aerului contaminat cu *Escherichia coli* s-ar putea datora acțiunii combinate atât a alicinei, tiosulfinaților cât și al altor compuși conținuți în extract a căror acțiune se potențează reciproc, așa cum s-a prezentat și în capitolul 6.1.
- O explicație al efectului decontaminant ar putea fi dat de acțiunea compușilor activi ai *Allium sativum* la nivelul membranelor bacteriilor.

Un avantaj major al decontaminării aerului cu extract de *Allium sativum* este și faptul că, fiind de natură vegetală, nu prezintă probleme în generarea de reziduuri nedorite.

În urma studiului efectului extractelor de *Allium sativum* asupra unor enzime oxido reducătoare și a unor parametrii ce își desfășoară

activitatea biologică în strânsă legătură cu acestea , s-au putut observa următoarele:

- Extractul concentrat (2.34 μ moli % tiosulfinați , 1.12 μ moli % alicină) afectează în mod evident echipamentul de oxidoreducere a celulei sanguine cât și funcțiile ficatului, având următoarele efecte:
 - scăderea hemoglobinemiei , în medie , cu 38.1% față de valoarea martorului
 - creșterea methemoglobinemiei după primele doze cu 103.1 % față de limitele normale evidențiate în literatura de specialitate
 - menținerea efectului extractului chiar și după șapte zile de la sistarea administrării acestuia
 - creșterea activității catalazei cu aproape 100 % , după administrarea a cinci doze, pentru ca după sistarea administrării , activitatea catalazei să se reducă chiar sub valoarea normală cu 25 %
 - creșterea activității methemoglobin reductazei, după primele cinci doze, cu aproape 97.3 % , urmată de o scădere a activității enzimei
 - creșterea activității catalazei și a methemoglobinreductazei conduce deasemenea la o reducere a activității glutathion reductazei cu până la 48.7% , față de activitatea martorului.
 - afectarea funcției normale a ficatului prin creșterea activității alanin amino transferaza (ALAT) , raportul de Rittis (ALAT/ASAT) înregistrând o valoare de 1.1 față de valoarea normală de 1.3.
 - scăderea proteinemiei odată cu creșterea numărului de doze , cu până la 17.9 %
 - scăderea sideremiei cu până la 48.7% față de valoarea martorului
 - efect antagonist față de al acidului ascorbic , față de care s-au efectuat toate determinările
- toate aceste efecte negative atât la nivelul sintezei de proteine , respectiv a hemoglobinei se repercutează asupra activității normale a oxidoreductazelor și conduc totodată la perturbarea funcției normale a unor organe cheie: ficat , splină și rinichi, după cum se va prezenta în subcapitolul 6.4.3.
- extractul concentrat acționează ca un toxic asupra organismului animal

Spre deosebire de activitatea evident nocivă a extractului concentrat , extractul diluat (0.56 μ moli % tiosulfinați , 0.12 μ moli % alicină) are un efect total antagonist ceea ce se observă atât din valorile activității oxidoreductazelor cât și a sintezei de hemoglobină

Se constată următoarele:

- creșterea hemoglobinemiei la o valoare medie de 13.8 g% Hb, cu 12 % mai mare decât a martorului; efectul este comparabil ce cel al acidului ascorbic, antioxidant și stimulator cunoscut al sintezei de hemoglobină
- scăderea methemoglobinemiei după prima doză administrată, efect ce se menține și la șapte zile după sistarea administrării (efect " retard ")
- scăderea activității catalazei similară cu cea produsă de administrarea acidului ascorbic
- stimularea activității methemoglobin reductazei cu până la 126.8%; această stimulare a activității methemoglobin reductazei se manifestă și după 7 zile de la sistarea administrării spre deosebire de acidul ascorbic a cărui efect se resimte numai până în momentul administrării, neavând o prelungire în timp a acestui efect și după sistarea administrării
- stimularea activității glutatation reductazei, după primele două doze administrate , ca odată cu sistarea administrării, activitatea glutatation reductazei să scadă cu până la 13.1 %; activitatea glutatation reductazei ,după administrarea a cinci doze de extract , este similară cu a acidului ascorbic
- extractul diluat de Allium sativum crește capacitatea sistemelor reducătoare eritrocitare prin creșterea activității methemoglobin reductazei, a glutatation reductazei pe de o parte , urmată de scăderea methemoglobinemiei, respectiv creșterea hemoglobinemiei.
- Valorile crescute ale methemoglobin reductazei și glutatation reductazei pot fi markeri indirecți de activare a metabolismului eritrocitar.
- Remanierile țesutului hepatic sunt activate și în consecință nivelul seric al transaminazelor ALAT și ASAT este crescut
- se înregistrează o stimulare a sintezei de proteine totale cu până la 10.6 % față de martor, probabil prin activarea sintezei extrahepatice de proteine.

- Se remarcă o corelație strânsă atât între activitatea catalazică și dozele de *Allium sativum* diluat cât și între activitatea catalazică și dozele de *Allium sativum* concentrat
- o corelație slabă și medie se remarcă între activitatea methemoglobinreductazei și dozele de extracte diluate respectiv concentrate de *Allium sativum*
- o corelație strânsă se remarcă și între activitatea glutatation reductazei și dozele de *Allium sativum* diluat, pe când față de *Allium sativum* concentrat corelația este slabă
- aceeași corelație slabă și medie se remarcă și între activitățile celor trei enzime
- activitățile catalazei, a methemoglobin reductazei , a glutatation reductazei și valorile hemoglobinei la loturile experimentale, față de loturile martor, sunt asigurate statistic , atât la cele tratate cu extract diluat cât și la cele tratate cu extract concentrat de *Allium sativum*

Efectele benefice ale administrării extractului diluat sunt similare cu cele ale acidului ascorbic conducând la stimularea întregului echipament oxidoreducător al celulelor prezentând totodată avantajul unui efect prelungit, chiar și după o săptămână de la sistarea administrării acestuia spre deosebire de acidul ascorbic care își manifestă acest efect numai pe perioada administrării.

În ceea ce privește influența extractelor de *Allium sativum* asupra unor organe la șobolani, s-au putut trage următoarele concluzii

- Extractul concentrat implică o serie de modificări la nivelul funcționării normale a splinei, ficatului , și rinichiului
- Se constată o dilatare a splinei , ceea ce denotă o hiperfuncție a acesteia
- După administrare unui număr mare de doze(8-16), se constată o proliferare masivă atât în limfonoduli cât și în tecile perifoliculare.
- Semnalarea , în cordoanele celulare perivasculare din pulpa roșie un număr sporit de macrofage și de limfoplasmocite
- Se semnalează apariția corpurilor Heinz , în număr de 4-5 / secțiune după 14 doze administrate , respectiv a 3-4 corpi Heinz / 0.031 mm² (aria unui câmp microscopic)

- Intensificarea răspunsului imun imediat (apariția de limfocite proactice)
- În cazul ficatului,o dată cu mărirea numărului de doze se observă o vacuolizare mult mai intensă atât perinucleară cât și citoplasmatică a hepatocitelor.
- Se observă o hipertrofie a nucleolilor, consecința fiind o creștere accentuată de sinteză de AND ribozomal (se observă de asemenea o activitate intensă de secreție proteică în hepatocite).
- Se observă o vacuolizare masivă cu semne de degenerescență a hepatocitelor;
- În multe celule , cromatina apare condensată în bulgări și apar chiar fenomene de carioliză.
- Ectaziile capilarelor sinusoidale sunt mai pronunțate; ca urmare a distrugerii hepatocitelor, printre cordoanele celulare apar nuclei eratici.
- Hepatocitele se caracterizează și prin avansarea fenomenului de poliploidie (crește numărul de nucleoli , chiar până la patru nucleoli la aproximativ 20 % dintre hepatocite)
- Fenomenul de citoliză hepatică se poate corela și cu afectarea activității transaminazelor serice, așa cum au fost prezentate în subcapitolul 6.4.1.
- La nivelul rinichiului se constată dilatații ale capsulei Bowmann și distrucția glomerulilor vasculari ai nefronilor
- Apar alterări ale barierei de filtrare , fenomen ce implică și foița viscerală cu podocite ale capsulei Bowmann cât și rețeaua capilară (celule endoteliale) ale glomerulului vascular.

Apar aspecte degenerative și la nivelul canalelor colectoare ale piramidelor renale, unde sunt remarcate desprinderi ale celulelor epiteliale de membrana bazală

În ceea ce privește influența extractelor de *Allium sativum* asupra formulei leucocitare s-au putut trage următoarele concluzii :

- Nu există deosebiri semnificative la șobolanii aflați în experiment, față de valorile normale ale lotului martor (a cărui parametri se situează la valori similare cu cele indicate de literatura de specialitate);
- O observație remarcabilă a fost legată de tipul limfocitelor circulante ; aproape 75 % dintre ele manifestă caracteristici evidente de activare; astfel ele

au dimensiuni de aproximativ 9-11µm diametrul, cu citoplasma bazofilă și granulațiuni azurofile;

- Se observă dimensiuni mari ale nucleului, cu cromatina în două nuanțe de violet, care demonstrează prezența unor forme de replicare și transcripție a materialului genetic și respectiv de biosinteză a unor mediatori chimici;
- Aceste limfocite active sunt probabil în majoritate limfocite T;
- Din rezultatele obținute se poate presupune că extractul prezintă o activitate de stimulare a limfocitelor în special în producția de citochine (mediatorii chimici);
- Se constată, la șobolanii din lotul experimental E, o stimulare a monocitelor , cu aproape 3 0% față față de valoarea maximă normală a lotului martor, fenomen ce s-ar putea explica printr-o acțiune stimulatorie a activității de fagocitoză exercitată, în țesuturile conjunctive;
- Are loc activarea fagocitozei prin care se întărește capacitatea de apărare a organismului față de agenții patogeni și se asigură și o refacere celulară și tisulară mai eficace.

În ceea ce privește influența extractelor de *Allium sativum* asupra nivelului *lipidelor serice* s-au putut trage următoarele concluzii:

- Prin administrarea de extract de *Allium Sativum*, chiar la indivizi cu hipercolesterolemie provocată se poate ajunge la o scădere a valorii colesterolului în plasmă, apropiată de valoarea normală indicată în literatura de specialitate.
- Scăderea colesterolemiei s-ar putea explica printr-o blocare a biosintezei de colesterol de către compușii cu sulf conținuți în extractul de *Allium Sativum*.
- Valorile activității alanin aminotransferazei (ALAT) la primele 3 loturi, denotă o ușoară creștere a activității enzimei ceea ce implică o activitate mai intensă a ficatului, activitate influențată în mare măsură atât de prezența unei cantități suplimentare de lipide cât și de influența extractelor de *Allium Sativum* (de existența compușilor cu sulf din extract).
- Prin administrarea unui extract concentrat de *Allium Sativum* activitatea enzimei ASAT se diminuează cu 13,90% față de valoarea normală a acesteia.
- raportul De Rittis (ASAT/ALAT) prezintă o valoare de aproximativ 1,10 ceea ce denotă o afectare a funcției ficatului atât în urma administrării

suplimentare de lipide cât și a extractului de *Allium Sativum*, în special a celui concentrat.

În urma studiului pentru identificarea proprietăților de imunostimulator al *Allium sativum* s-au concluzionat următoarele:

- Extractul de *Allium sativum* stimulează sinteza efectorilor specifici și nespecifici atât la lotul de animale vaccinat la un nivel mai ridicat decât valorile înregistrate la lotul martor, cât și în cazul lotului căruia i s-au administrat și micotoxine;

- Se evidențiază efectul stimulatv al extractului de *Allium sativum* asupra sintezei de properdină serică: extractul de *Allium sativum* inhibă efectul imunotoxic al micotoxinelor.

- Extractul de *Allium sativum* potențează în măsură mai redusă sinteza lizozimului seric în prezența micotoxinelor.

Rezultatele obținute evidențiază efectul cumulativ al micotoxinelor asupra sintezei de lizozim seric.

- Extractul de *Allium sativum* inhibă efectul imunotoxic al micotoxinelor.

- La sfârșitul perioadei experimentale, ca urmare a efectelor toxice cumulative a micotoxinelor valoarea indicelui fagocitar la sfârșitul perioadei experimentale este mai mică decât la celelalte loturi

- Extractul de *Allium sativum* stimulează procesul de citoformare a limfocitelor

- Efectul imunostimulatv al extractului de *Allium sativum* se manifestă numai la concentrații mici de micotoxine

- Valoarea semnificativ crescută a titrului de anticorpi antiMycoplasma în răspunsul imun primar , relevă că extractul de *Allium sativum* poate fi administrat numai o singură dată în scopul stimulării răspunsului imun .

- La sfârșitul experimentului, titrul de anticorpi înregistrat este semnificativ mai mare decât a martorului (47.3 ± 1.87 DO față de 34.0 ± 2.23 DO) dar este mai mic decât cel înregistrat la în cazul lotului E1.

- Extractul de *Allium sativum* pe lângă efectul imunostimulator , influențează pozitiv și valorificarea hranei de către animal;

•La lotul martor sporul mediu zilnic a fost de 0.378 g / zi , animalele din lotul E1 au înregistrat un spor de 0.488g/zi cu o creștere de 29.1 % ;

Efectul benefic al extractului de *Allium sativum* asupra dezvoltării corporale ale animalelor se reflectă și în cazul prezenței micotoxinelor, sporul mediu zilnic înregistrat la animalele din lotul E2 fiind de 0.337g/zi față de 0.378g/zi la animalele din lotul martor.

În ceea ce privește efectul imunostimulator asupra tineretului taurin, s-au concluzionat următoarele:

•Properdina și lizozimul seric ca factori umorali nespecifici, sunt stimulați de extractul de *Allium sativum*

• Indicele fagocitar prezintă valori semnificativ mai mari la lotul stimulat cu *Allium sativum* numai după prima administrare;

• Extractul de *Allium sativum* are o acțiune mai moderată asupra elementelor celulare, raportul neutrofile/ limfocite se inversează după 14 zile de la administrare.

• Stimulează mai intens sinteza factorilor umorali de apărare și are o acțiune moderată asupra factorilor celulari ;

• Rezultatele obținute pledează pentru utilizarea extractului de *Allium sativum* în potențarea vaccinurilor cu o imunogenitate mai scăzută.

Se poate concluziona că planta *Allium sativum* indigen prezintă o compoziție chimică a compușilor de bază, similară cu cea a acestei plante din alte regiuni ale Terrei, iar prin testele biochimice și biologice efectuate s-a determinat că administrarea unui extract apos diluat de *Allium sativum* are efecte benefice asupra organismelor animale , și anume: crește activitatea bactericidă și bacteriostatică, crește activitatea echipamentului enzimatic antioxidant, scade nivelul lipidelor serice și crește activitatea răspunsului imun. Pe de altă parte s-a dovedit și faptul că prin administrarea extractelor apoase concentrate acestea pot acționa ca și substanțele toxice, diminuând activitatea enzimelor antioxidante protectoare, măbind cantitatea de methemoglobină a sângelui testat , apariția corpilor Heinz precum și inducerea apariției unor modificări nefaste la nivelul organelor : ficat, splină și rinichi .

BIBLIOGRAFIE

1. Abdel - Fattah, A.F. , A study on the composition of garlic skins and the structural features of the isolated pectic acid, *J. Sci Food. Agr.*1972, 23, 871
2. Abdel - Fattah, A.F. , ş.a. , Pectin of garlic skins, *J.Chem. Agr.*, 1970, 13,27
3. Abdullah, T., In vitro efficacy of a compound derived from garlic against *Pneumocystis carinii* , *J Natl Med Assoc*, 1996, 88, 694, 704
4. Abraham, K.O. , ş.a. , Oxidimetric determination of the volatile oil, *Flavor Ind.*, 1973, 4,310
5. *Abriss der Laboratoriumstierkunde*,VEB Gustav, Fischer Verlag, Jena, 1961
6. Addis, P.B., Carr, T., Hassel, C.A., Huang, Z., Warner, G., Atherogenic and anti-atherogenic factors in the human diet, *Biochem. Soc. Symp.*, 1995, 61, 259-71
7. Adler, A., Holub, B.,Effect of garlic and fish-oil supplementation on serum lipid and lipoprotein concentrations in hypercholesterolemic men *Am J Clin Nutr*, 1997, 65, 445-50
8. Agarwal , K.,Therapeutic actions of garlic constituents, *Med Res Rev*, 1996, 16, 111-24
9. Alexander, M.M. , ş.a. , Pectic substances in onion and garlic skins, *J.Chem. Sci. Food Agr.*1973, 24,611
10. Ali , M., Thomson, M., Consumption of a garlic clove a day could be beneficial in preventing thrombosis, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1995, 53, 211-2
11. Ali, M., Mechanism by which garlic (*Allium sativum*) inhibits cyclooxygenase activity. Effect of raw versus boiled garlic extract on the synthesis of prostanoids, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1995, 53, 397-400
12. Alice, D., Sivaprakasam, K., Antibiotics and garlic clove extract--inhibitory agents of cell wall degrading enzymes, *Hindustan Antibiot Bull*, 1995, 37, 44-7
13. Andrews, P., Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration, *Biochem.J.*, 1964, 91, 222-233
14. Andrews,P., The gel-filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range, *Biochem.J.*, 1965,96, 595-605
15. Apiz - Castro, R. , Effects of garlic extract and of three pure components isolated from it on human platelet aggregation, arachidonate metabolism, release activity and platelet ultrastructure,*Thromb. Res.*1983, 32,155
16. Appleton, J.,Tansey,M., Inhibition of growth of zoopathogenic fungus by garlic extract,*Mycologia*, 1975, 67,882-885
17. Arens,M., Kroll, Ostermann, G., Composition of garlic , *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1986, 88, 152-158
18. Armentia, A., Can inhalation of garlic dust cause asthma? , *Allergy*, 1996, 51, 137-8
19. Attrep, K.A. , ş.a. , Separations and identifications of prostaglandine, *Lipids*, 1980, 15, 292
20. Augusti, K., Sheela, C., Antiperoxide effect of S-allyl cysteine sulfoxide, an insulin secretagogue, in diabetic rats, *Experientia*, 1996, 52, 115-20
21. Augusti, K.,Therapeutic values of onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum*) *Experientia*, 1996, 52, 120-27

22. Augusti, K.T. , Matheu, P.T. , Lipid Lowering effect of allicin on long term feeding to normal rats, *Experientia*,1973, 30/5,468
23. Bandyopadhyay, C. , Studies on the flavor components of Allium I. Thin layer chromatographic investigation of onion, *J. Chromatogr.*, 1970, 47,400
24. Banhegyi, G., Csala, M., Braun, L., Ascorbate synthesis dependent glutathione consumption in mouse liver, *FEBS Lett.*, 1996, 381, 39-41
25. Barnett,Y.A., Brennan, L.A., O' Farrell, F., Hannigan, B.M., Oxidant-induced stress response in lymphoid cells, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1995, 37, 273-81
26. Barone,F., Tansey, M., Isolation , purification, identification, synthesis and kinetics of activity of the anticandidal component of Allium sativum, and a hypothesis for its mode of action, *Mycologia*, 1977, 69,793-825
27. Batirel, H., Aktan,, S., Aykut, C., Yegen, B., Coskun, T.,The effect of aqueous garlic extract on the levels of arachidonic acid metabolites (leukotriene C4 and prostaglandin E2) in rat forebrain after ischemia-reperfusion injury, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1996 , 54, 289-92
28. Bayer, T., Neue schwefelhaltige Inhaltstoffe aus Allium cepa L. mit antiastmatischer und anti allergischer Wirkung , *Dissertation der Fakultat für Chemie und Pharmazie , Munchen*, 1988, 25-31
29. Beaglehole ,R .,Garlic for flavour, not cardioprotection, *Lancet*, 1996, 348, 1186-7
30. Bedeleanu,D., Kory, M.,Metabolismul medicamentelor, *Bibl.farmacistului*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca,1976,245-250
31. Beker, A. , Ein Beitrag zur Biogenes und Biochemie antimicrobiell wirkender eterischer Ole der Kuchenzwiebel, *Qual. Plant. , Plant Foods Hum. Nutr.* ,1975, 25,107
32. Bennet, E. , A note on the presence of piruvic acid in Ebenezer onions, *Plant Physiol.*, 1945, 20,461
33. Bernhard, R. , Chematoxonomy : distribution studies of sulphur compounds in Allium, *Phytochemistry*, 1970, 9,2019
34. Bernhard, R.A. , Comparative distribution of aliphatic disulphides derived from fresh and dehydrated onions *J. Food Sci.*, 1968, 33,298
35. Biedermann, B., Garlic--a "secret miracle of God"?, *Schweiz Rundsch Med Prax*, 1995 , 84, 7-10
36. Block, E., Putman, D.,Zhao, Shu-Hai, Allium Chemistry: GC-MS Analysis of thiosulfinates and related compounds from onion , leek, scallion, shallot, chive and chinese chive, *J.Agric. Food Chem.*1992, 40,2431-2438
37. Block, E., The organosulfur chemistry of the genus Allium- Implications for the organic chemistry of sulfur, *Angew. Chem.Int.Ed.Engl.*, 1992, 31, 1135-1178
38. Block,E., Antimutagenic effects of ajoene, an organosulfur compound derived from garlic, *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60, 2086-8
39. Block,E., Naganathan,S., Putman, D., Zhao,Shu-Hai, Allium chemistry: HPLC analysis of thiosulphynates from onion, garlic, wild garlic shallot, elephant garlic , chive and chinese chive, *J.Agrc.Food Chem.*, 1992, 40,2418-2430
40. Boelens, M. , ş.a. , Volatile flavor compounds from onion, *J. Agr. Food Chem.* 1971, 20 ,984

41. Bordia ,T.,Mohammed, N., Thomson ,M., Ali ,M .,An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1996, 54, 183-6
42. Brenner, S., Ruocco, V., Wolf, R., de Angelis, E., Lombardi, M.L., Pemphigus and dietary factors. In vitro acantholysis by allyl compounds of the genus Allium, Dermatology, 1995, 190, 197-202
43. Brodnitz, M.H. , ş.a. , Flavor components of garlic extracts, J. Agr. Food Chem., 1971,19,273
44. Burnham, B.,Garlic as a possible risk for postoperative bleeding ,Plast Reconstr Surg, 1995, 95, 213
45. Canduela, V., Mongil, I., Carrascosa, M., Docio, S., Cagigas, P ., Garlic: always good for the health?, Br. J. Dermatol., 1995 , 132, 161-2
46. Caporoso, N., Smith, S., Eng, R., Antifungal activity in human urine and serum after ingestion garlic, Antimicrob. Agents and Chemoteraphy, 1983,23,700-705
47. Carotenuto, A., De Feo, V., Fattorusso, E., Lanzotti, V., Magno, S., Cicala, C., The flavonoids of Allium ursinum, Phytochemistry, 1996, 41, 531-6
48. Carson,J., Wong,F., A color reaction for thiosulphinates, Nature,1959,183,1673
49. Cavalitto, C., Bailey,J., Alkylthiosulfinates , Journal of American Chemical Society, 1947,69, 1710-1713
50. Cavallito,C., Bailey,J., Allicin, the antibacterial principle of Allium sativum : isolation,physical propreties and antibacterial action , Journal of American Chemical Society , 1944, 66, 1950-1954
51. Ceaşescu,D.,Tratarea statistică a datelor chimico analitice, Ed. Tehnică,Bucureşti, 1973
52. Cellini , L., Di Campi, E.,Masulli, M., Di Bartolomeo, S., Allocati, N., Inhibition of Helicobacter pylori by garlic extract (Allium sativum), FEMS Immunol Med Microbiol, 1996, 13, 273-7
53. Chae, H., Kang, S., Rhee, S., Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA), J.Biol. Chem., 1996, 271, 15315 – 21
54. Cheng, J., Meng, C., Tzeng, C., Lin J., Optimal dose of garlic to inhibit dimethylhydrazine-induced colon cancer, World J Surg, 1995, 19, 621-5
55. Chivers AW ., Garlic breath, Vet Rec, 1995, 136, 132
56. Christensen, R.E. ş.a., Analysis of garlic for its metal contents, J.Ind. Chem Soc. 1980, 57, 1121
57. Christopher,M., The red blood cell and oxidative damage: primary target, innocent bystander or effective scavenger ?, Proceedings of the VIIth Congress of ISACB, Glasgow,UK, 1996,47
58. Ciplea, A., Richter,K., The protective effect of Allium sativum and crataegus on isoprenaline induced tissue necroses in rats, Arzneimittell Forschung,Drug Research ,1988,38,123
59. Colowick, S., Kaplan, N., Protein and derivatives, Methods in enzymology,v.III, Acad.Press, N.Y., 1957,447-528
60. Colowick,S., Kaplan, N., Methods in enzymology, Academic Press, N.Y.,1957, III,256-258
61. Creppy, E., Baudrimont, I., Betbeder, A.M., Prevention of nephrotoxicity of ochratoxine A , a food contaminant, Toxicol. Lett., 1995, 82-83, 869-77

62. Cuiban, F., Alfa Xenia Lupea, Studiul structurii și sintezei peptidelor, 1989, Ed. Academiei, București, 71-78
63. Currie, H., Photometric estimation of volatile sulfur in onions as a criterion of pungency, Food Res., 1945, 10, 177
64. Curzio, D.A., Ceci, L., Evaluation of enheral extracts of irradiated garlic, Food Chem. 1984, 14, 287
65. Dabritz, E., Virtanen, A.I., S Vinylcysteine S oxide, a homolog of the precursor of the lacrymatory substance in onion, Chem. Ber., 1965, 98, 781
66. Darbyshire, B. & col., Differences in fructan content and synthesis in some Allium species, New Phytol. 1981, 87, 249
67. Das, I., Hirani, J., Sooranna, S., Arginine is not responsible for the activation of nitric oxide synthase by garlic, J Ethnopharmacol, 1996, 26, 53, 5-9
68. Das, I., Khan N., Sooranna S., Potent activation of nitric oxide synthase by garlic: a basis for its therapeutic applications, Curr Med Res Opin, 1995, 13, 257-63
69. Das, I., Khan, N., Sooranna, S., Nitric oxide synthase activation is a unique mechanism of garlic action, Biochem Soc Trans, 1995, 23, 136S
70. Das, T., Choudhury, A., Sharma, A., Talukder, G., Effects of crude garlic extract on mouse chromosomes in vivo, Food Chem Toxicol, 1996, 34, 43-7
71. Das, N.N., ș.a., Structure of the D-galactan isolated from garlic bulbs, Biochem Soc Trans., 1990, 19, 26
72. Davis, L., Jin-Kun Shen, Jan Cai, Antifungal activity in human cerebrospinal fluid and plasma after intravenous administration of Allium sativum, Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 1990, 34, 651-653
73. De La Paz, M.A., Zhang, J., Fridovitch, I., Antioxidantes enzymes of human retina: effect of age on enzyme activity of macula and periphery, Curr. Eye Res., 1996, 15, 273-8
74. De Rooij, B., Boogaard, P., Rijksen, D., Commandeur, J., Vermeulen, N., Urinary excretion of N-acetyl-S-allyl-L-cysteine upon garlic consumption by human volunteers, Arch Toxicol, 1996, 70, 635-9
75. Decun, M., Igiena Veterinară și protecția mediului, Ed. Helicon, 1997, 314
76. Deutsch, J.C., Ascorbic acid and dehydroascorbic acid interconversion without net oxidation or reduction, Anal Biochem, 1997, 247, 58-62
77. Deveny, T., Gergely, J., Analytische Methoden zur Untersuchung von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen, 1968, 45-52, Akademiai Kiado - Budapest
78. Di Gianni, P., Minnuci, F.S., Alves Rosa, M.F., Anti-oxidants inhibit the enhancement of the immune response caused by oil adjuvants, Scand. J. Immunol., 1996, 43, 413-20
79. Dikalov, M., Skatchkov, M., Bassenge, E., Spin trapping of superoxide radicals and peroxynitrite by 1-hydroxy-3-carboxy-pyrrolidine and 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine and the stability of corresponding nitroxyl radicals towards biological reductants, Biochem Biophys Res Commun, 1997, 231, 701-4
80. Dipiro, J., Taylor, T., Steel, J., Lack of influence of commonly used drugs on bioassay indicator organisms, Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 1983, 23, 703-705
81. Dorant, E., van den Brandt, P.A., Goldbohm, R.A., Allium vegetable consumption, garlic supplement intake, and female breast carcinoma incidence, Breast Cancer Res. Treat, 1995, 33, 163-70

82. Doss, S.H. ş.a. , Studies on the Egyptian onion byproducts, Egypt. J. Food. Sci., 1979, 7,49
83. Drake, I., Davies, M., Mapstone, N., Dixon, M., Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals, Carcinogenesis, 1996 Mar, 17:3, 559-62
84. Du, C.T. ş.a. , Antocyanine of garlic (*Allium Sativum*), J. Food Sci. 1975, 40 , 101
85. Dubois, M. , Gills, K.A. , Hamilton, J.K. , Determination of phenolsulphidric acid, Analytical Chemistry , 1956, 28, 350
86. Dumitru I.F. , Dana Iordăchescu , Introducere în enzimologie , 1981, Ed. Medicală, Bucureşti
87. Edelhoch, H. ,Cantitative determination of sulfur compounds in allium sativum, Biochemistry, 1964, 6,1948
88. Eichenberger, W. ş.a. , Uber die quantitative Bestimmung von Sterinderivaten in Pflanzen, FEBS Letters, 1990, 11,177
89. Eilat, S., Oestraicher, Y., Rabinkov, A., Ohad, D., Mirelman, D., Battler, A., Eldar, M., Vered, Z.,Alteration of lipid profile in hyperlipidemic rabbits by allacin, an active constituent of garlic, Coron Artery Dis, 1995, 6, 985-90
90. Ekkerhard, M., Uber neue Wirkstoffe aus Knoblauch und Kuchenzwiebel, PhD These, Munchen, 1974,12-19
91. El - Abbady, A.M. ş.a. Studies on the Egyptian onion byproducts, Agr. Biol. Chem. , 1979, 43,1977
92. El-Sabban, F., Fahim, M., Radwan, G., Zaghloul, S., Singh, S., Garlic preserves patency and delays hyperthermia-induced thrombosis in pial microcirculation, Int J Hyperthermia, 1996, 12, 513-25
93. Erazo, G.S. , ş.a. , Effects of storage conditions on some chemical proprieties of onion, Sintetica Aliments,1981, 6,13
94. Eriksson, C., Na,A., Antioxidant agents in raw materials and processed foods, Biochem. Soc. Symp., 1995, 61,221-34
95. Ernst, E. , Cardioprotection and garlic , Lancet 1997, 349 , 157
96. Ettala,T. , Virtanen, A.I. , Labeling of sulfur comtaining aminoacids, and gamma glutamyl peptides after injection of labelled sulfate in onion, Acta Chem. Scand., 1962, 16,2061
97. Exarcu- Teodorescu, I., Patologie biochimică,Ed. Medicală, Bucureşti, 1974
98. Faber, L. , The chemical evaluation of pungency of onion and garlic by the content of volatile reducing substances, Food Tech., 1967 11,621
99. Farkas , G.L.& col, Role of Phenolic compounds on the physiology of plantdiseases and disease resistance, Phytopath . Zeitschr. 1962,44.105
- 100.Fenwick, R., , Hanley , H., The genus Allium , revue, CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition ,1987, 23,1,342-376
- 101.Fildberg, R., Chang, S., Kotik,A., In vitro mechanism of inhibition of bacterial all growth by allacin, Antimicrob.agents and chemotherapy, 1988, 32, 1763- 75
- 102.Fiorani, M., De Sanctis, R., Saltarelli, R., Stocchi, V., Hexokinase inactivation induced by ascorbic acid/Fe(II) in rabbit erythrocytes is independent of glutathione-reductive processes and appears to be mediated by dehydroascorbic acid, Arch Biochem Biophys, 1997 , 342, 191-6

103. Fiorani, M., Saltarelli, R., De Sanctis, R., Role of dehydroascorbate in rabbit erythrocyte hexokinase inactivation induced by ascorbic acid/Fe(II), *Arch Biochem Biophys*, 1996, 334, 357-61
104. Fiorio, R., Bronzetti, G., Diallyl sulfide inhibits the induction of HPRT-deficient mutants in Chinese hamster V79 cells treated with dimethylnitrosoamine in the presence of S-9 of rats induced with acetone, *Environ Mol Mutagen*, 1995, 25, 344-6
105. Fischer L., *An introduction to gel chromatography*, 1971, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London
106. Focke, M., Feld, A., Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl-CoA synthetase, *FEBS LETTERS*, 261, 106, 1990
107. Fraaije, M.W., Roubroeks, H.P., Hagen, W., Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimum*, *Eur. J. Biochem.*, 1996, 235, 192-98
108. Freeman, G.G., A rapid spectrophotometric method of determination of thiopropanal -S-oxide (lacrimary) in onion and its significances in flavor studies, *J. Sci. Food Agr.* 1976, 27, 1689
109. Freeman, G.G., *et al.*, Effect of sulphate nutrition on flavor components of onion (*Allium Cepa*), *J. Sci. Food Agr.* 21, 610 1970
110. Freeman, G.G., *et al.*, Influence of sulfate nutrition on the flavor components of garlic (*Allium Sativum*) and wild onion (*Allium vineale*), *J. Sci. Food Agr.* 1971, 22, 330
111. Freeman, G.G., *et al.*, A rapid spectrophotometric method of determination of thiopropanal -S-oxide (lacrimary) in Alliums, *J. Sci. Food Agr.* 1974, 25, 538
112. French, J.A. *et al.*, Determination of aminoacids in garlic, *J. Chromatog.* 1979, 80, 133
113. Fromtling, R., Bulmer, G., In vitro effect of aqueous extract of garlic on the growth and viability of *Cryptococcus neoformans*, *Mycologia*. 1978, 70, 397-405
114. Fuyiwara, M., *et al.*, Discovery of the reaction of allthiamine, *J. Biochem.*, 1970, 41, 29
115. Gaal, T., Speake, B., Noble, R., Antioxidant parameters and ageing in some animal species, *Proceedings of the VIIth Congress of ISACB*, Glasgow, UK, 1996, 46
116. Gaetani, G.F., Ferraris, A.M., Rolfo, M., Mangerini, R., Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes, *Blood*, 1996, 87, 1595-99
117. Gebhardt, R., Beck, H., Differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte cultures, *Lipids*, 1996, 31, 1269-76
118. German, K., Kumar, U., Blackford, H., Garlic and the risk of TURP bleeding, *Br. J. Urol.*, 1995, 76, 518
119. Ghannoum, M., Inhibition of candida adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of *Allium sativum*, *J. of Applied Bacteriology*, 1990, 68, 163-169
120. Ghatak, S., Ho, S.M., Age-related changes in the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation status in ventral and dorsolateral prostate lobes of noble rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, 222, 362-7
121. Ghosh, M., Mukhopadhyay, M., Chatterjee, I., NADPH-initiated cytochrome P450-dependent free iron-independent microsomal lipid peroxidation: specific prevention by ascorbic acid, *Mol. Cell Biochem.*, 1997, 166, 35-44

122. Goryacenkova, E.V. , Enzyme in garlic which forms allycin a protein with phosphopiridoxal, Chem. Abstr., 1953, 47,4928
123. Granroth, B. , Biosynthesis and decomposition of cysteine derivatives in onion and other species of *Allium*, Ann. Acad. Sci. Fenn., 1970, 154,9
124. Grechkin, A., Hamberg, M., Divinyl ether synthase from garlic (*Allium sativum* L.) bulbs: sub-cellular localization and substrate regio-and stereospecificity, FEBS Lett, 1996, 388, 112-4
125. Grechkin, A.N., Fazliev, F.N., Mukhtarova, L.S., The lipoxygenase pathway in garlic (*Allium sativum* L.) bulbs: detection of the novel divinyl ether oxylipins, FEBS Lett, 1995 , 371, 159-162
126. Greene, L.S., Asthma and oxidant stress : nutritional, environmental, and genetic risk factors, J.Am. Coll. Nutr., 1995, 14, 317-24
127. Gruffyd, R. , Fenwick, Hanley, A., The genus *Allium*; medicinal effects, CRC Critical reviews in Food Sciene and nutrition, v.23,1, 1986
128. Hageman, G., van Herwijnen, M., Schilderman, P., Rhijnsburger, E., Moonen, E., Kleinjans, J., Reducing effects of garlic constituents on DNA adduct formation in human lymphocytes in vitro, Nutr Cancer, 1997, 27, 177-85
129. Hames, B.D. Gel electrophoresis of proteins — A practical Approach London, Washigton IRL Press, 1981,42-65
130. Han, J., Lawson, L., Han, G., Han, P., A spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfinates, Anal Biochem, 1995 , 225, 157-60
131. Harkness, J., Obermann, H., Lichter, H., Adler, D., Book reviews -Breast cancer : colaborative manegement , Lewis Publisher Inc., 1988, 81, 371-375
132. Hatanaka, H. , ş.a. , Enzymatic assay of scordinine as the main tonic principle active in garlic used in health food, Jpn. J. Hygiene, 1980, 35, 746
133. Held, K.D., Sylvester, F.C., Hopcia, K.L., Role of Fenton chemistry in thiol- induced toxicity and apoptosis, Radiat. Res., 1996, 145, 542-53
134. Herklots, G.A. ş.a. , Vegetables in South East Asia, George Allen Ltd.London, 1972
135. Hirata ,R., Matsushita , S., Reducing activity level of alliin, Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60, 484-5
136. Hocquemeller, R., Cortes, A., Arango, G., Myint, S., Cave, A., Isolement et synthese de espintanol, nouveau monoterpene , antiparasitaire, J.of Natural products, 1991, 54, 445-452
137. Horhammer, L., Wagner, H., Seitz, M., Vejdelek, Z., Zur Wertbestimmung von Knoblauchpreparaten , Die Pharmazie, 1968, 23(8), 462-467
138. Hu, X., Benson, P., Srivastava, S., Mack, L., Xia, H., Gupta, V., Zaren, H., Singh, S., Glutathione S-transferases of female A/J mouse liver and forestomach and their differential induction by anti-carcinogenic organosulfides from garlic , Arch Biochem Biophys, 1996 15, 336, 199-214
139. Iberl, B., Winkler, G., Muller, B., Knobloch, Quantitative determination of allicin and alliin from garlic by HPLC, Planta Medica, 1990, 56, 320-326
140. Ionescu, S., Savopol, E., Extracte farmaceutice vegetale, Ed. Medicală, Bucureşti, 1977, 23

141. Ip, C., Lisk, D., Thompson, H., Selenium-enriched garlic inhibits the early stage but not the late stage of mammary carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 1996, 17, 1979-82
142. Ip, C., Lisk, D., Efficacy of cancer prevention by high-selenium garlic is primarily dependent on the action of selenium, *Carcinogenesis*, 1995, 16, 2649-52
143. Isenberg, N., Thiosulfinates, *Int. J. Sulphur Chem.* 1973, 8, 307
144. Jaiswal, S., Bordia, A., Radio-protective effect of garlic *Allium sativum* Linn. in albino rats, *Indian J Med Sci*, 1996, 50, 231-3
145. Jocelyn, P.C., *Biochemistry of the SH group*, Academic Press, New York, 1972
146. Kabelic, J., Antimicrobielle Eigenschaften des Knoblauch, *Pharmazie* 1970, 25, 266- 270
147. Kamanna, V.S., Chandrasekhara, K., Lipid composition of garlic, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1986, 88, 136-139
148. Kawakishi, S., *et al.*, Effects of gamma irradiation on the enzyme relating to the development of characteristic odour of onions, *J. Agr. Food Chem.* 1971, 19, 166
149. Keogh, B., Allen, R., Pignolo, R., Expression of hydrogen-peroxide and glutathione metabolizing enzymes in human skin fibroblasts derived from donors of different ages, *J. Cell Physiol.*, 1996, 167, 512-22
150. Ketiku, A.O., The chemical composition of *Allium* species, *Food Chem.* 1976, 1, 41
151. Kihara, Y., *et al.*, Carbohydrates of the bulbs of *Allium* IX., *J. Agr. Chem. Soc. Jpn.* 1989, 15, 348
152. Knon, J. *et al.*, An examination of the free amino acids of the common onion, *Food Sci.* 1963, 28, 298
153. Koch, H., The long path toward "odorless garlic", *Pharm Unserer Zeit*, 1996, 25, 186-91
154. Kohmann, E.E., Onion pungency and onion flavor. Their chemical determination, *Food Technol.* 1952, 6, 288
155. Kohoko, L. N. *et al.*, Levels of naturally occurring lithium in onions and garlic, *Vopr. Pitan.*, 1963, 66
156. Krajcovicova-Kudlackova, M., Ozdin, L., Effect of fatty acid composition, cadmium and vitamin E intake on prooxidative-antioxidative state of rat liver, *Vet. Med.*, 1995, 40, 293-98
157. Kris-Etherton, P., Etherton, T., Yu, S., Efficacy of multiple dietary therapies in reducing cardiovascular disease risk factors, *Am J Clin Nutr*, 1997, 65, 560-1
158. Kwon, J., Yoon, H., Changes in flavor components of garlic resulting from gamma irradiation, *J. of Food Science*, 1985, 50, 1193
159. Lancaster, J., Collin, H., Determination of the garlic allin lyase on S-methyl-L-cystein sulphoxide, *Plant Science Letters*, 1981, 22, 169-176
160. Lancaster, J.E., *et al.*, Quantitative analyses of the S-alk(en)yl L-cysteine sulfoxides in onion (*Allium Cepa*), *J. Sci. Food Agr.* 1983, 34, 1229
161. Lancaster, J., The levels of precursors, the S-alk(en)yl L-cysteine sulfoxides during the growth of the onion (*Allium Cepa*), *J. Sci. Food Agr.* 1984, 35, 415
162. Larner, A., How does garlic exert its hypocholesterolaemic action? The tellurium hypothesis, *Med Hypotheses*, 1995, 44, 295-7
163. Lawson, L., Hughes, B., Characterization of the formation of allicin and other thiosulfinates from garlic, *Planta Medica*, 1992, 58(4), 345-350

164. Lawson, L., Wang, Z., Hughes, B., γ -Glutamyl-S-Cysteines in garlic and other Allium species :precursors of age-dependent trans-1-propenyl thiosulfinates, *J. of Natural Products*, 1991, 54(2), 436-444
165. Lazur Evskii, G.V. , Structure and activity of steroidal glycosides, *Pharm. Chem.* 1979, 7, 49
166. Lea M., Organosulfur compounds and cancer. *Adv Exp Med Biol*, 1996, 401, 147-54
167. Leinweber, F., Monty, K., Cysteinsulfinic acid: Fuchsin method, *Methods in enzymology*, Academic Press, N.Y., 1987, 143, 135
168. Leth, T. ş.a., Vitamine E content of fresh vegetables, *Food Sci. Tehnol. Abstr.* 1983, 15, 12 J 1857
169. Leth, T. ş.a., Vitamine E content of frozen as compared to fresh vegetables, *Pflanzen*, *FEBS Letters*, 1990, 11, 177
170. Lichtenthaler, H.K., Goltz, A., Inhibition of plant acetyl-CoA synthetase by alkyladenylates, *Z. Naturforsch.*, 1992, 47c, 845-850
171. Lichtenthaler, H., Focke, M., Plant acetyl-CoA synthetase assay, *Z. Naturforsch.*, 1987, 42c, 1361-1363
172. Lowry, O.H. , ş.a. , Protein colorimetric determination, *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265
173. Lu , J., Pei, H., Ip, C., Lisk, D., Ganther, H., Thompson ,H ., Effect on an aqueous extract of selenium-enriched garlic on in vitro markers and in vivo efficacy in cancer prevention. *Carcinogenesis*, 1996, 17, 1903-7
174. Lukes, T.M. , Thin layer chromatography of cysteine derivatives of onion flavor compounds and the lacrymatory factors, *J. Food Sci.* , 1971, 36, 662
175. Lunec, J., Oxidative stress and antioxidants, *Proceedings of the VIIth Congress of ISACB*, Glasgow, UK, 1996, 45
176. Malkki, J. , ş.a. , The composition and aroma of onions and influencing factors, *J. Sci. Agr. Soc. Fin.* , 1978, 50, 103
177. Mankarios, A., Jones, C., Jarvis, M., Therfall, Friend, J., Hydrolysis of plant polysaccharides and GLC analysis of their constituent natural sugars, *Phytochemistry* , 1979, 18, 419-422
178. Manta I., Cucuianu, M., Benga, G., Hodâmău, A., *Metode biochimice în laboratorul clinic*, 1976, Ed. Dacia, Bucureşti
179. Mathew, B., Daniel, R., Augusti, K., Hypolipidemic effect of garlic protein substituted for casein in diet of rats compared to those of garlic oil, *Indian J Exp Biol*, 1996, 34, 337-40
180. Mathiesen, L., Wang, S., Halvorsen, B., Malterud, K., Sund, R., Inhibition of lipid peroxidation in low-density lipoprotein by the flavonoid myricetin B and ascorbic acid, *Biochem Pharmacol*, 1996 , 51, 1719-25
181. Mathur, P.B. , Extension of storage life of garlic bulbs by gamma irradiation, *Int. J. Appl. Rad. Isotop.* 1963, 14, 625
182. Matikkala, E.J. ş.a. , On the quantitative determination of peptides of onions, *Acta Chem. Scand.* 1967, 21, 298
183. Matsukyava, T. , ş.a. , Products of the reaction between thiamine and ingredients of the plants of Allium genus, *Science* 1953, 118, 325
184. Matsunaga, I., Yamada, M. Kusunose, E., Direct involvement of hydrogen peroxide in bacterial alpha-hydroxylation of fatty acid, *FEBS Lett.*, 1996, 386, 252-54

185. Mazelis, M. , Crews, L. , Purifications of the allin lyase of garlic, *Allium Sativum*, *Biochem. J.* 1968, 108,735
186. Mazelis, M., Demonstration and characterization of cysteine sulfoxide lyase in the crucifere, *Phytochemistry* ,1963,22, 15-22
187. Mazza, G. , ş.a. , Volatile retention during the dehydration of onion, *Lebensm. Wiss. u. Technol.* , 1979, 12,333
188. Mazza, G., Relative volatilities of some onion flavour components, *J.Food Tech.* 1980, 15, 35-41
189. Mc Cord, Joe,M., The importance of oxidant- antioxidant balance, *Oxid. Stress Dis.* 1998,1, 1-7
190. Mekinova, D., Beno, I., Volkovova, K., Levels of erythrocyte glutathione and ceruloplasmine and transferrin in the serum and their role in antioxidant protection, *Bratisl. Lek. Listy*, 1996, 97, 196-9
191. Melzig, M.F., Krause, E., Franke S, Inhibition of adenosine deaminase activity of aortic endothelial cells by extracts of garlic (*Allium sativum* L.), *Pharmazie*, 1995 , 50, 359-61
192. Mennella, J., Johnson, A., Beauchamp, G., Garlic ingestion by pregnant women alters the odor of amniotic fluid, *Chem Senses*, 1995, 20, 207-9
193. Mikhin, V., Gromnatskii, N., The effect of garlic preparation alisat on the level of lipid peroxidation products, activity of various antioxidant enzymes, and blood level of lipoproteins in patients with atherosclerosis ,*Biull Eksp Biol Med*, 1996, 122, 502-4
194. Minor, T., Niessen, F., Klauke, H., Isselhard, W., No evidence for a protective effect of ascorbic acid on free radical generation and liver injury after hemorrhagic shock in rats, *Shock*, 1996 , 5, 280-3
195. Mochizuki, E., Yamamoto, T., Suzuki, S., Nakazawa, H., Electrophoretic identification of garlic and garlic products, *J AOAC Int*, 1996, 79, 1466-70
196. Moore, A.B.& col. , Changes in chromatographic profile of antocyanins of red onion during extraction, *J. Food Prot.* 1982,45,738
197. Moore, G., Atkins,R., The fungicidal and fungistatic effects of an aqueous garlic extract on medically important yeast-like fungi, *Mycologia*,1977,69,349-351
198. Moore,S. , Stein, W.H. , *Methods in Enzymology*, V.I. , 19 - 831,1963, Academic Pres, New-York
199. Moriguchi, T., Saito, H., Nishiyama, N., Aged garlic extract prolongs longevity and improves spatial memory deficit in senescence-accelerated mouse., *Biol Pharm Bull*, 1996, 19, 305-7
200. Morimitsu , Morioka, J., Kawakiski, Inhibitors of platelet aggregation generated from mixtures of *Allium* species and /or S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides, *J.Agric.Food Chem.*,1992, 40, 368-372
201. Morris, J., Burke, V., Mori, T., Vandongen, R., Beilin, L., Effects of garlic extract on platelet aggregation: a randomized placebo-controlled double-blind study, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1995, 22, 414-7
202. Moxness,S., Brunauer, L., Huestis, W., Hemoglobin oxidation products extract phospholipids from the membrane of human erythrocytes, *Biochemistry*, 1996 , 35, 7181-7

203. Mumtaz, A. , ş.a. , Inhibition of sprouting in onions by gamma radiati, Food Irrad. 1970, 10,10
204. Mutsch-Eckner, M., Eldermeier, C.A., Sticher, O.A novel aminoacid glycoside and three amino acids from *Allium sativum*, J. of Natural , Products, 1993,56,864-869
205. Myers, S., Smith, A., Cardioprotection and garlic, Lancet, 1997 Jan 11, 349:9045, 131-2
206. Myers, S., Smith ,A., Effects of garlic extract on platelet aggregation , Clin Exp Pharmacol Physiol, 1995, 22, 888-9
207. Naganawa , R., Iwata, N., Ishikawa, K., Fukuda, H., Fujino, T., Suzuki, A., Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic, Appl Environ Microbiol, 1996 62, 4238-42
208. Naito, S. , &col. , Fraction on antioxidant extracted from garlic, J.Jpn. Soc. Food, Sci. Tech. 1981,28,465
209. Naito, S., ş.a. , Studies on natural antioxidants, J. Jpn. Soc. Food Sci. Tech. 1981,28,291
210. Nakata C., Aakata,T.,Hishikawa,The colorimetric determination of allicin, Anal.Biochem., 1970, 37, 92-97
211. Nash, A., Galbraith, D., Mooney, C., Austin, M ., Garlic breath ,Vet Rec, 1995, 136,155
212. Neil, H., Silagy, C., Lancaster, T., Hodgeman, J., Vos, K.,Moore ,J., Jones, L., Cahill, J., Fowler, G., Garlic powder in the treatment of moderate hyperlipidaemia: a controlled trial and meta-analysis, J R Coll Physicians Lond, 1996, 30, 329-34
213. Nishimura, H. , ş.a. , Changes in flavor components of onion by gamma irradiation, Agr. Biol. Chem. 1971,35, 1831
214. Nishimura, H. , ş.a. , Effects of gamma irradiation on development of lachrymatary of onion , Agr. Biol. Chem. 1975, 39,2245
215. Nishimura, H. , ş.a. , Studies on the radiolysis of sulfur - containing aminoacids, Agr. Biol. Chem. 1970, 39, 609
216. Nock, L. , Mazelis, M. , The C-S lyases of Higher Plants : Preparation and properties of homogenous Allin Lyase from Garlic, Arch. Biochem. Biophys. 1986, 249,27
217. Nock,L.,Mazelis, M., Direct comparison of the physical properties of homogenous alliin lyase of garlic and onion , Plant.Physiol. 1987,85, 1079-1083
218. Numagami, Y., Sato, S., Ohnishi S.,Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants, Neurochem Int, 1996 , 29, 135-43
219. Odin, A.,Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action, Mutat Res, 1997 , 386, 39-67
220. Oka Y. , &col. , Sterol composition of vegetables, J.Jpn. Soc. Food. Nutr. , 1973, 26,121
221. Olariu L., Bârsan M., Trif R., Study on the bactericid and bacteriostatic effects in *Allium Sativum*, Lucr.ş. Med. Vet. , Timișoara 1991, XXV, 29-32
222. Olariu, L., Chișu, I., Lupea, A., Preparation and characterisation of some *Allium sativum* extracts, Lucr.ş. Med. Vet., Timișoara 1996,XXIX, 35

223. Olariu, L., Şincăi, M.- Influenţa unui extract concentrat de *Allium sativum* asupra unor organe , la şobolani, Simpozionul de Medicină veterinară, Timişoara, noiembrie, 1998
224. Olariu, L., Lupea, A., Ardelean, A., ALLIUM SATIVUM-a medicinal plant used in prophylactic treatment of different diseases, Jurnalul Medical Arădean, 1(1), 53-57, 1997
225. Olariu, L., Chişu, I., Suciuc, A., Influenţa administrării unui extract concentrat de *Allium sativum* asupra unor enzime oxido reducătoare din eritrocit, la şobolani, Lucr. şt. Med. Vet., Timişoara 1997, XXX pag.
226. Olariu, L., Chişu, I., Suciuc, A., Influenţa administrării unui extract concentrat de *Allium sativum* asupra unor parametri biochimici la şobolani, Lucr. şt. Med. Vet., Timişoara 1996, XXIX pag.
227. Olariu, L., Trif, R., Stana, L., Chişu, I., Studiul efectului imunostimulator şi antitoxic al extractului de *Allium sativum*, la suine, Scientific debates, Present interests in animal pathology , Cluj-Napoca, 1998, II, 595 - ?
228. Olariu, L., Trif, R., Stana, L., Chişu, I., Efectul imunostimulator al extractului de *Allium sativum*, la bovine, Scientific debates, Present interests in animal pathology , Cluj-Napoca, 1998, II, 605 - ?
229. Olariu, L., Stana, L., Dărăbuş, G., Influenţa extractelor concentrate de *Allium sativum* asupra colesterolemiei, lipidelor totale şi trigliceridelor la şobolani, Simpozionul de Medicină veterinară, Timişoara, noiembrie, 1998
230. Olariu, L., Lupea, A., Separarea şi determinarea masei moleculare a allinazei, enzima cheie din *Allium sativum*, Chem. Bull. Univ. Politehnica Timişoara, 43, 1998, sub tipar
231. Olinescu, R., Peroxidarea în chimie, biologie şi medicină, Ed. Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1982
232. Oliver, M., Which changes in diet prevent coronary heart disease? A review of clinical trials of dietary fats and antioxidants, Acta Cardiol, 1996, 51, 467-90
233. Olson, E.J., Epperson, W., ş.a. Effects of an allicin-based product on cryptosporidiosis in neonatal calves, J. Am. Vet. Med. Assoc, 1998, 212, 987-990
234. Orekhov, A., Tertov, V., Sobenin, I., Pivovarova, E., Medvedeva, L., Skalbe, T., Direct antiatherogenic effect of garlic , Biull Eksp Biol Med, 1996, 121, 695-7
235. Orekhov, A.N., Tertov, V.V., Sobenin, I.A., Pivovarova, E.M., Direct anti-atherosclerosis-related effects of garlic, Ann Med, 1995, 27, 63-5
236. Pai, S., Platt, M., Antifungal effects of *Allium sativum* (garlic) extract against the *Aspergillus* species involved in otomycosis, Lett Appl Microbiol, 1995, 20, 14-8
237. Pant , R. ş.a. The water soluble sugars and total carbohydrate content of onion , garlic and turnip , Flora , Jena , 1962, 152, 530
238. Pantoja, C., Norris, B., Contreras, C., Diuretic and natriuretic effects of chromatographically purified fraction of garlic (*Allium sativum*), J Ethnopharmacol, 1996, 52 , 101-5
239. Parry, R.G. , Naidu, M.V. , Determination of the absolute configuration of (-) S (2 carboxi propil) L cisteine, Teth. Lett. 1983, 24, 1133

240. Pearson, R., Steigbigel, R., Davis, H., Chapman, S., Method for reliable determination of minimal lethal antibiotic concentration, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1980, 18, 699-708
241. Perrin Nadif, R., Dusch, M., Koch, C., Catalase and superoxid dismutase activities as biomarkers of oxidative stress in workers exposed to mercurz vapors, *J. Toxicol. Envir. Health*, 1996, 48, 107-119
242. Platenius, H. , ş.a. , The pungency of the onion bulb as influenced by the stage of development of the plant, *Proc. Amm. Soc. Hort. Sci.* 1935, 33, 481
243. Prasad ,K., Laxdal , V., Yu ,M., Raney, B., Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic , *Mol Cell Biochem*, 1996 ,154, 55-63
244. Prasad, K., Laxdal, V., Yu, M., Raney, B., Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic, *Mol Cell Biochem*, 1995, 148, 183-9
245. Prasad, G., Sharma, V., Efficacy of garlic treatment against experimental candidiasis in chicks, *Brit. Vet. J.*, 1980, 136, 448-451
246. Pratt, D.E. , The antioxidant activity of vegeables extracts, *J. Food. Sci.*
247. Pruthi, J.S. , ş.a. , Some technological aspects of dehydration of garlic, *Food Sci.* 1959, 8, 436
248. Rabinkov, A., Wilchek, M., Mirelman, D., Alliinase (alliin lyase) from garlic (*Allium sativum*) is glycosylated at ASN146 and forms a complex with a garlic mannose-specific lectin, *Glycoconj J.*, 1995 , 12, 690-8
249. Rahman, K., Billington, D., Rigby, G., Cardioprotection and garlic, *Lancet*, 1997, 349, 131
250. Reicks, M., Crankshaw D., Modulation of rat hepatic cytochrome P-450 activity by garlic organosulfur compounds, *Nutr Cancer*, 1996, 25, 241-8
251. Resch , L., Ernst, E., Garlic (*Allium sativum*)--a potent medicinal plant, *Fortschr Med*, 1995, 113, 311-315
252. Rietz, B., Belagyi, J., Török, B., Jacob R., The radical scavenging ability of garlic examined in various models, *Boll Chim Farm*, 1995, 134, 69-76
253. Rohrbach, J., Garlic breath, *Vet Rec*, 1995, 136, 132
254. Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J., Alarcon-Aguilar, F., Anti-hyperglycemic effect of some edible plants, *J. Ethnopharmacol*, 1995, 48, 25-32
255. Rudneva-Titova, Change in the activity of antioxidant enzymes in the process of early ontogenesis of various species of Black Sea fishes, *Ukr. Biokim. Zh.*, 1995, 67(1), 92-5
256. Rundquist, C. , Pharmacological investigations of *Allium* bulbs, *Pharm. Notis. Blat.* 1989, 18, 323
257. Sakagami, H., Satoh, K., Effect of ascorbate oxidase on radical intensity and cytotoxic activity of ascorbate , *Anticancer Res*, 1997, 17, 1163-6
258. Sakamoto, J., Proces of deodorizing garlic , U.S. Patent Office 3.326.696 , 1965
259. Sambo, P., Fadlon, E.J., Sironi, M., Reactive oxygen intermediates cause a rapid release of the interleukin-1 decoy receptor from human myelomonocytic cells, *Blood*, 1996, 87, 1682-6
260. Sămăilă, M., Lazăr, Ş., *Lucrări practice de chimie și biochimie vegetală*, Lito IAT, Timișoara, 1980

261. Sanchez de Himenez ,E., Torres, J., Studies on the oxidation-reduction systems of the erythrocyte, *Biochem.J.*, 1965, 97, 887-891
262. Schactirle, G., Pollack, R., A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material, *Anal. Biochem.*, 1973, 51, 654-655
263. Schaffer, E., Liu, J., Milner, J., Garlic powder and allyl sulfur compounds enhance the ability of dietary selenite to inhibit 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary DNA adducts, *Nutr Cancer*, 1997, 27, 162-8
264. Schuphan, W.ş.a. , Arginin als Stikstoffreserve, *Ernehrungs Umschau* 1967, 23, 75
265. Schwimmer, S. , Mazelis, M. , Characterization of allinase of *Allium Cepa*, *Arch. Biochem. Biophys.* 1963, 100, 66
266. Schwimmer, S., Enzymatic conversion of trans (+) S lpropenil Lcystein S-oxide the bitter and odor bearing components of onion, *Phytochemistry*, 1968, 7, 401
267. Sendl, A., Elbl, G., Steinke, B.,ş.a., Comparative pharmacological investigations of *Allium ursinum* and *Allium sativum*, *Planta Medica*, 1992, 1(58), 1-7
268. Sendl, A., Wagner, H., Isolation and identification of homologues of ajone and alliin from bulb extracts of *Allium ursinum* , *Planta Medica*, 1991, 4(57), 361-362
269. Sestili, P., Brandi, G., Brambilla, L., Cattabeni, F., Cantoni, O., Hydrogen peroxide mediates the killing of U937 tumor cells elicited by pharmacologically attainable concentrations of ascorbic acid: cell death prevention by extracellular catalase or catalase from cocultured erythrocytes or fibroblasts, *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 1996 , 277, 1719-25
270. Sheela, C., Augusti K., Antiperoxide effects of S-allyl cysteine sulphoxide isolated from *Allium sativum* Linn and gugulipid in cholesterol diet fed rats, *Indian J Exp Biol*, 1995 , 33, 337-41
271. Sheela, C., Kumud, K., Augusti, K., Anti-diabetic effects of onion and garlic sulfoxide amino acids in rats , *Planta Med*, 1995, 61, 356-8
272. Sheela, C.G., Augusti, K.T., Effects of S-allyl cysteine sulfoxide isolated from *Allium sativum* Linn and gugulipid on some enzymes and fecal excretions of bile acids and sterols in cholesterol fed rats, *Indian J Exp Biol*, 1995 , 33, 749-51
273. Sheen , L., Lii ,C., Sheu, S., Meng, R., Tsai, S., Effect of the active principle of garlic--diallyl sulfide-on cell viability, detoxification capability and the antioxidation system of primary rat hepatocytes, *Food Chem Toxicol*, 1996, 34, 971-8
274. Shen ,J., Davis, L., Wallace ,J., Cai ,Y., Lawson, L., Enhanced diallyl trisulfide has in vitro synergy with amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*, *Planta Med*, 1996, 62, 415-8
275. Simons, L., Balasubramaniam, S., Von Konigsmark , M., Parfitt, A., Simons, J., Peters, W., On the effect of garlic on plasma lipids and lipoproteins in mild hypercholesterolaemia, *Atherosclerosis*, 1995 , 113, 219-25
276. Singh , S., Mohan R., Agarwal , R, Benson, P., Hu ,X., Rudy, M., Xia, H., Katoh ,A., Srivastava S., Novel anti-carcinogenic activity of an organosulfide from garlic: inhibition of H-RAS oncogene transformed tumor growth in vivo by diallyl disulfide is associated with inhibition of p21H-ras processing. , *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 225, 660-5

277. Singh, A., Rao, A., Evaluation of the modifying influence of arecanut on the garlic-modulated hepatic detoxication system enzymes, sulfhydryl content, and lipid peroxidation in mice, *Teratog Carcinog Mutagen*, 1995, 15, 127-34
278. Singh, S., Abraham, S., Kesavan P., In vivo radioprotection with garlic extract, *Mutat Res*, 1995, 345, 147-53
279. Sinha, A.; Determination of catalase, *Anal. Biochem.*, 1985, 47, 394-98
280. Sivam, G., Lampe, J., Ulness, B., Swanzy, S., Potter, J., *Helicobacter pylori*--in vitro susceptibility to garlic (*Allium sativum*) extract, *Nutr Cancer*, 1997, 27:2, 118-21
281. Smeets, K., Van Damme, E., Verhaert, P., Barre, A., Rougé, P., Van Leuven, F., Peumans, W., Isolation, characterization and molecular cloning of the mannose-binding lectins from leaves and roots of garlic (*Allium sativum* L.), *Plant Mol Biol*, 1997, 33, 223-34
282. Smoczkiwicz, M.A., ş.a., Microdetermination of steroid and triterpene saponineglycosides in various plant materials, *Microchim. Acta*, 1982, 1142
283. Sooranna, S., Hirani, J., Das, I., Garlic can induce both GTP cyclohydrolase and nitric oxide synthase activity in choriocarcinoma cells, *Biochem Soc Trans*, 1995, 23, 543S
284. Srinivasan, M.ş.a., Carbohydrates of garlic and onion, *Current Sci.* 1959, 28, 281
285. Steinbuch, E., Van Deelen, W., Enzymatic production of vegetable and fruit juices, *Confructa Studien*, 1986, 30, 15-23
286. Steiner, M., Khan, A., Holbert, D., Lin, R., A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effect of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids, *Am J Clin Nutr*, 1996, 64, 866-70
287. Stoianova - Ivanova, B., On the composition of fatty acids of *Allium Sativum*, *C.R. Bulg. Science* 1971, 27, 503
288. Stoll, A., Seebeck, E., Allin, the pure mother substances of garlic oil, *Experientia*, 1947, 3, 114
289. Stoll, A., Seebeck, E., *Allium* compounds, *Helvetica Chimica Acta* 1948, 31, 189
290. Stoll, A., Seebeck, E., *Über den enzymatischen Abbau der Allinns*, *Helv. Chim. Acta.* 1949, 32, 197
291. Stoll, A., Seebeck, E., Chemical investigation on allin, the specific principle of garlic, *Advances in Enzymology*, 1951, 11, 377
292. Sugii, M., ş.a., Isolation of (-) Spropenyl L - cysteine from garlic, *Chem. Pharm. Bull*, 1963, 11, 548
293. Suzuki, T., ş.a., Metabolic compounds and incorporation of L - valine C¹⁴ into S - 2 carboxypropylglutathion and 2 carboxypropylcysteine in garlic, *Chem. Pharm. Buul.* 1962, 10, 328
294. Swimmer, S., Ryan, C., Wong, F., Specificity of L Cysteine sulfoxide lyase and partially competitive inhibition by S-alkyl-L-cysteines, *The J. of Biochem.*, 1964, 239
295. Şincai, M., *Histologie și embriologie animală*, Ed. Mirton, Timișoara, 1998
296. Şincai, M., Marcu, A., *Biologie celulară*, E. Mirton, Timișoara, 1997
297. Takahashi, M., Niki, Etsno, Oxidative stress on cells by oxygen radicals and its inhibition by antioxidants, *Oxid. Stress Dis.* 1998, 1, 9-14
298. Tang, Z., Shen, Z., Liu, S., The effect of topically garlic solution painting on experimental oral precancer and oral cancer in rats, *Chung Hua Kou Chiang Hsueh Tsa Chih*, 1995, 30, 232-4

299. Tchernychev, B., Rabinkov, A., Mirelman D., Wilchek, M., Natural antibodies to dietary proteins: the existence of natural antibodies to alliinase (Alliin lyase) and mannose-specific lectin from garlic (*Allium sativum*) in human serum, *Immunol Lett*, 1995, 47, 53-7
300. Tobkin, H., Mazelis, M., Allin lyase- Preparation and characterization of the homogenous enzyme from onion bulb, *Arch. of Biochem. And biophys.*, 1979, 193, 150-157
301. Trif R., Tîrziu E., Bolte S., Pantîru C., Olariu L., Cercetări privind efectul stimulator al unor extracte vegetale, Al 2-lea Simpozion internațional BIOTechnos București, 1994, 29
302. Trif, R., Tîrziu, E., Bolte, S., Pantîru, C., Olariu, L., Researches on the immunostimulation effect of some plant extracts, Al VI Congr. Naț. de Med. Vet. Sinaia, 1994
303. Trif, R., Vior, C., Patologia sistemului imunitar, Ed. Brumar, 1996
304. Trif, R., ș.a. Microbiologie, Lito IAT, Timișoara, 1995
305. Țîbru, I., Olariu, L., Efectul decontaminant al extractului de *Allium sativum*, *Scientific debates, Present interests in animal pathology*, Cluj-Napoca, 1998, II, 609
306. Ueda, J., Tsubuku, T., Miyajima, R., Composition of Sulfur containing components in onion and their flavor characters, *Biosci. Biotech. Biochem.* 1994, 58, 108-110
307. Ueda, J., Kawajiri, H., Miyamura, N., Miajima, R., Content of some sulfur -containing components and free aminoacids in various strains of garlic, *Nippon Shokukin Kogyo Gakkaishi*, 1991, 5, (38), 429-434
308. Ueda, J., Kawajiri, H., Miyamura, N., Miajima, Kimizuka, A., Characteristic flavor constituents in water extract of garlic, *Agric. Biol. Chem.*, 1990, 54, 163-169
309. Uglea C., Cromatografia pe gel permeabil, 1976, Ed. Academiei, București
310. Vâlcu, A., Eritrocitul – morfologie, fiziologie, fiziopatologie, Ed. Medicală, București, 1977
311. Venugopal, P., Venugopal, T., Antidermatophytic activity of garlic (*Allium sativum*) in vitro, *Int. J. Dermatol*, 1995, 34, 278
312. Vevera, V., Fiziopatologia și chimia fierului, Ed. Medicală, București, 1978, 62-65
313. Virtanen, A., Studies on organic sulphur compounds and other labile substances in plants, *Phytochemistry*, 1995, 4, 207-288
314. Wada, H., Snell, E.E., *J. Biol. Chem.* 1961, 236, 2089-2095
315. Wang, E., Li Y Lin, M., Chen, L., Stein, A., Reuhl, K., Yang, C., Protective effects of garlic and related organosulfur compounds on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice, *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 136, 146-54
316. Wargovich, M., Uda, N., Woods, C., Velasco, M., McKee, K., *Allium* vegetables: their role in the prevention of cancer, *Biochem Soc Trans*, 1996, 24, 811-4
317. Watt, B.C. & col. - Composition of foods; Raw, processed, prepared, *Agricultural Handbook Nr. 8*, U.S. Departement of Agr., 1963
318. Weber, N., Anderson, D. ș.a., In vito verucidal effect of *Allium Sativum*, *Planta Medica*, 1992, 58(5); 417-423
319. Wei-Cheng, Blot, W., Chang, Y., Ershow A., *Allium* vegetables and reduced risk of stomach cancer, *J. Nat. Cancer inst.*, 1989, 81, 162-164

320. Weis, M., Rundgren, M., Nelson, S., Moldeus, P., Peroxidase – catalyzed oxidation of 3,5-dimethyl acetaminophen causes cell death by selective protein thiol modification in isolated rat hepatocytes, *Chem. Biol. Interact.*, 1996, 100, 255-65
321. Wen, G., Mato, A., Wisniewski, H., Malik, M., Jenkins, E., Sheikh, A., Kim, K., Light and electron microscopic immunocytochemical localization of two major proteins in garlic bulb, *J Cell Biochem*, 1995, 58, 481-9
322. Whitley, R., Tucher, B., Kinkel, A. Pharmacology, tolerance and antiviral activity of vidarabine monophosphate in humans, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1980, 18, 709-715
323. Willis, E., Enzyme inhibition by allicin, the active principle of garlic, 1956, 63, 211-216
324. Witaker, J.R., Development of flavor, odor and pungency in onion and garlic, *Adv. Food Res.* 1976, 22, 73
325. Wong, R., Kondo, Y., Banba, H., Matsuzaki, S., Sekine S, Anti-Helicobacter pylori activity in the garlic extract, *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi*, 1996, 93, 688
326. Wunsch, A., Freie Aminosäuren und Proteinaminosäuren in Blatt; Wurzelgemüse, *Landwirtschaft. Forsch.* 1975, 28, 345
327. Yagami, M., *et al.*, Identification of intermediates in the formation of onion flavors, *Agr. Biol. Chem.*, 1980, 44, 2533
328. Yamada, Y., Amuza, K., Evaluation of the in vitro antifungal activity of allicin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1977, 11, 743-749
329. Yang, B., Yamazaki, M., Wan, Q., Kato, N., Comparison of the response of serum ceruloplasmin and cholesterol, and of tissue ascorbic acid, metallothionein, and nonprotein sulfhydryl in rats to the dietary level of cystine and cysteine, *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60, 1933-6
330. Yang, K.Y., Lipids and fatty acids compos. of garlic, *Korean J. Food Sci. Technol.* 1982, 14, 388
331. Yue - sheng Zhang, Xing- ruo Chen, Antimutagenic effect of garlic on 4 NQO-induced mutagenesis in Escherichia Coli WP-2, *Mutation Research* 1989, 227, 215
332. Zamfirescu Gheorghiu, Marcela, Popescu, Aurora,, *Tratat de biochimie medicală*, Ed. Medicală, București, 1991
333. Zhang, J.L., Shi, Z.X., Zhang, H.Y., Progress in the prevention and treatment of ischemic cerebrovascular diseases with garlic extract, *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 1995, 15, 124-6
334. Zohri, A., N., Abdel-Gawad, K., Saber, S., Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa* L.) oil, *Microbiol Res*, 1995, 150, 167-71

Prin aceasta certific realizarea personală, integrală și fără ajutor nepermis și nemenționat, al întregii lucrări prezentate.

Ing. Lucia Ileana Olariu

Universitatea de Științe Agricole și
Medicină Veterinară – Timișoara