

UNIVERSITATEA "POLITEHNICA" TIMIȘOARA

FACULTATEA DE CHIMIE INDUSTRIALĂ
ȘI INGINERIA MEDIULUI

Ing. Vincu Mirela

TEZĂ DE DOCTORAT

Oligoelemente metalice de interes biologic și toxicologic în mușchi și organe la animale, cu un model experimental al translocării

Conducător științific:
Prof. Dr. Zeno Gârban

369 642.456
E

2004

Prefață

Prezenta teză de doctorat include investigațiile efectuate asupra unor oligoelemente metalice decelate în mușchi și organe destinate consumului alimentar, iar la acestea se adaugă studiul efectelor induse de zinc și mangan asupra unui model experimental animal. Astfel, obiectivele cercetărilor întreprinse pentru elaborarea tezei au fost direcționate pe două secțiuni. Prima secțiune a avut în vedere probleme de nutriție – vizând micronutrienții de natură minerală, precum și unele elemente cu potențial toxicogen. În acest sens s-a urmărit distribuția unor biometale și metale cu potențial toxicogen din mușchi și organe la bovine și suine. Secunda secțiune a urmărit probleme de biochimie – interesând instituirea unui model experimental animal asupra căruia s-au efectuat studii privind statusul homeostaziei biochimice a unor metaboliți sanguini, precum și concentrația unor biometale și metale cu potențial toxicogen din rinichi după administrarea a două oligoelemente (mangan și zinc) în exces.

Elaborarea tezei de doctorat s-a făcut sub conducerea științifică a d-lui Prof. Dr. Zeno Gârban, în cadrul Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului de la Universitatea „Politehnica” Timișoara.

În perioada de pregătire a tezei am contribuit la elaborarea a 15 lucrări științifice publicate în diverse periodice, iar unele prezentate la congrese internaționale – din țară și străinătate – publicate în volumele acestora.

În acest sens, exprim mulțumiri D-lui Prof. Dr. Zeno Gârban pentru înalta competență cu care a coordonat cercetările extrem de laborioase întreprinse în vederea elaborării referatelor și susținerii examenelor pe parcursul perioadei de pregătire a doctoratului. De asemenea, mulțumesc pentru încrederea acordată, susținerea morală și pentru răbdarea cu care domnul profesor a condus cercetările, participând personal la unele etape experimentale care au dus la finalizarea acestei teze de doctorat.

În perioada investigațiilor specifice primei secțiuni a tezei am fost și sprijinită, pentru efectuarea diverselor analize fizico-chimice (bazate pe spectroscopia de absorbție atomică), cu deosebită competență și încredere de D-nul Prof. Dr. Ing. Mihail Dumitru – Directorul Institutului de Cercetări Pedologice și Agrochimice din cadrul Academiei de Științe Agricole și Silvicultură București, căruia îi exprim înaltă considerație și profundă grațitudine.

De asemenea, adresez sincere mulțumiri D-lui Prof. Dr. Ing. Nicolae Vaszilcsin – Prodecan la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului, Universitatea „Politehnica” din Timișoara, care m-a sprijinit și îndrumat în pregătirea unor etape analitice din cadrul realizării investigațiilor asupra modelului experimental din teza de doctorat.

Efectuarea determinărilor analitice de laborator necesare secunde secțiuni s-a făcut cu sprijinul și prin bunăvoința D-lui Prof. Dr. Constantin Dogaru de la Facultatea de Stomatologie – Șef al Laboratorului Clinic de la Spitalul Clinic Municipal Timișoara și D-lui Biolog Drd. Victor Precob, cărora le exprim sincere mulțumiri și profundă considerație.

D-rei Asistent universitar Drd. Corina Pascu de la Facultatea de Medicină Veterinară din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara, doresc să-i mulțumesc pentru deosebita colaborare în vederea obținerii de animale pentru realizarea experimentului.

Adresez mulțumiri pe această cale și D-nei Drd. Ing. Mihaela Pup – doctorand la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului de la Universitatea „Politehnica” din Timișoara, care m-a sprijinit în diverse etape analitice.

Tuturor colegilor de la disciplină și doctoranzilor din specialitate, care în diverse etape experimentale efectuate pe animale și în unele faze ale analizelor fizico-chimice și-au adus contribuția și m-au sprijinit, le mulțumesc pentru ajutor și înțelegerea acordată.

În fine, dar nu în ultimul rând mulțumesc familiei mele – care cu înțelegere, încredere și răbdare m-au înconjurat în toți acești ani, m-au ajutat să ajung la finalul acestui drum, adeseori anevoios, dar care mă împlinește sufletește și îmi dă încrederea de a merge mai departe.

Introducere	1
1. Distribuția metalelor în natură și în sistemele biologice	3
1.1. Considerații generale	3
1.2. Distribuția naturală a metalelor – privire sinoptică	5
1.2.1. Distribuția unor metale în mediu	6
1.2.1.1. Distribuția în sol	6
1.2.1.2. Distribuția în apă	7
1.2.1.3. Distribuția în aer	11
1.2.2. Distribuția metalelor în diverse produse alimentare	12
1.2.2.1. Distribuția în produse alimentare de origine vegetală	12
1.2.2.2. Distribuția în produse alimentare de origine animală	17
1.2.2.3. Distribuția în alte produse alimentare	21
1.2.3. Distribuția metalelor în organismul uman	21
1.3. Acțiunea compușilor minerali asupra diversilor metaboliți	24
1.3.1. Acțiunea compușilor minerali asupra metaboliților glucidici	25
1.3.2. Acțiunea compușilor minerali asupra metaboliților lipidici	27
1.3.3. Acțiunea compușilor minerali asupra metaboliților protidici	29
1.3.4. Acțiunea compușilor minerali asupra metabolismului hidro-electrolitic	31
1.4. Bioelemente metalice și metale cu potențial toxicogen	34
1.4.1. Rolul și mecanismele de acțiune ale unor bioelemente metalice	35
1.4.1.1. Macroelemente metalice prezente în organismul uman	35
1.4.1.2. Oligo- și microelemente metalice prezente în organismul uman	39
1.4.2. Efectele biochimice ale unor metale cu potențial toxicogen	47
2. Metode analitice și bioanalitice în investigarea metalelor	55
2.1. Principii metodologice generale	55
2.2. Caracteristici structurale ale metalelor în relație cu activitatea biologică	56
2.3. Principalele metode de investigare a metalelor din produse biologice	56
2.4. Metode specifice de investigare a unor parametrii biochimici sanguini	63
2.5. Calculul rezultatelor	69

2.5.1. Definierea unor termeni utilizați în calcularea rezultatelor	69
2.5.2. Eliminarea datelor eronate	70
2.5.3. Evaluarea statistică a rezultatelor	72
2.6. Spectroscopia de absorbție atomică – caracteristici experimentale și aplicații	73
2.6.1. Privire generală	73
2.6.2. Emisia și absorbția atomică	74
2.6.3. Caracteristici metodologice	76
2.6.4. Aplicații analitice	79
2.6.5. Interferențe în spectroscopia de absorbție atomică	80
2.6.5.1. Interferențe în atomizarea în flacără	80
2.6.5.2. Interferențe în atomizarea în cuptorul de grafit	82
3. Investigarea oligoelementelor metalice prezente în țesuturi la animale destinate obținerii de produse alimentare	84
3.1. Privire sinoptică	84
3.2. Importanța investigației micronutrienților metalici pentru organismul uman	84
3.2.1. Implicații în fiziologie	85
3.2.2. Implicații în fiziopatologie	86
3.3. Investigarea unor micronutrienți metalici din țesuturi animale	88
3.3.1. Prelevarea probelor	88
3.3.2. Pregătirea probelor analitice	89
3.3.3. Determinări cantitative	90
3.3.4. Studiul metalelor prezente în mușchi și în organe	91
4. Cercetări asupra translocării unor oligoelemente metalice la animale de laborator	106
4.1. Instituirea unui model experimental	106
4.1.1. Condiții de pregătire a animalelor de experiență	106
4.1.2. Specificul metodologiei experimentale utilizate	108
4.2. Cercetări experimentale prin utilizarea metodei gavajului	109
4.2.1. Procedura administrării compușilor metalici salini	109
4.2.2. Concentrația metalelor în soluțiile administrate	111
4.2.3. Prelevarea de probe și determinările biochimice	114
4.2.4. Calculul statistic al rezultatelor obținute	118
4.3. Investigarea unor metaboliți sanguini în relație cu administrarea de compuși metalici	118
4.3.1. Efecte induse de mangan asupra unor metaboliți sanguini	123

4.3.2. Efecte induse de zinc asupra unor metaboliți sanguini	140
4.3.3. Efecte induse de mangan și zinc asupra unor biometale și a unor metale cu potențial toxicogen din țesut renal	153
4.4. Efectul oligoelementelor administrate experimental asupra biodisponibilității	162
4.4.1. Conceptul de biodisponibilitate în relație cu aportul de oligoelemente	162
4.4.2. Biodisponibilitatea și interacțiunea dintre oligoelemente	163
4.4.3. Interacțiunile care limitează mobilitatea oligoelementelor metalice	164
Concluzii	167
Referințe bibliografice	171

Introducere

În ceea ce privește organismul uman, mineralele considerate a face parte din grupa oligoelementelor sunt necesare în dietă în concentrații relativ mici. Încă din anul 1986 – în cadrul primei manifestări a Societății Internaționale de Cercetare a Oligoelementelor din organismul uman (International Society of Trace Element Research in Humans – ISTEPH), un număr din ce mai mare de elemente a fost prezent ca având rol foarte important în nutriția umană și animală pe lângă elementele deja cunoscute în acest sens. În general, aceste descoperiri au fost rezultatul unor studii în care anumite deficiențe de oligoelemente au fost urmărite în condiții de stress nutrițional, metabolic, hormonal sau psihologic – atât pe organismul uman, cât și pe organismul unor animale de laborator.

Având în vedere aceste aspecte care subliniază importanța studiilor din domeniul abordat și continua cercetare cu dorința de a descoperi noi funcții biologice, efectele cauzate de carența sau excesul în organism, precum și aplicarea unor metode optime de analiză biochimică, împreună cu D-nul Prof. Dr. Gârban Zeno am ales titlul: „Oligoelemente metalice de interes biologic și toxicologic în mușchi și organe la animale, cu un model experimental al translocării”.

Obiectivele acestei teze de doctorat au fost determinarea unor biometale și metale cu potențial toxicogen din mușchi și organe la animale, precum și stabilirea unor interrelații metabolice între mangan și zinc în cazul administrării în doze care depășesc necesarul zilnic recomandat, prin aplicarea unor tehnici de biochimie analitică optime.

Teza de doctorat cuprinde patru capitole distincte în care au fost abordate două secțiuni: prima având profil de documentare generală, și secunda parte cuprinde aspecte de cercetare în domeniul nutriției umane și a biochimiei aplicative. Partea de cercetare a fost prezentată în două secțiuni: prima – din domeniul nutriției urmărește determinarea cuantumului unor biometale și metale cu potențial toxicogen din probe prelevate de la bovine și suine. Secunda parte experimentală prezintă efectele consecutive translocării unor oligoelemente la animale de laborator. Datele astfel expuse sunt urmate de concluzii și bibliografie.

Capitolul 1, având titlul „Distribuția metalelor în natură și în sistemele biologice” abordează probleme legate de distribuția unor metale în mediu, prezentându-se în subcapitole separate distribuția acestora în sol, apă și aer. De asemenea, într-un alt subcapitol sunt expuse date referitoare la distribuția metalelor în produse alimentare, cu detalierea acestora în funcție de origine, respectiv produse alimentare de origine vegetală, produse alimentare de origine animală, dar și în alte produse alimentare.

Aspectele relatate anterior sunt urmate de prezentarea unor date legate de acțiunea compușilor minerali asupra diverșilor metaboliți. Astfel, sunt expuse date referitoare la diverși metaboliți glucidici, lipidici, protidici și compuși ai metabolismului hidro-electrolitic în relație cu unele minerale.

O atenție deosebită se acordă și prezentării mecanismelor de acțiune, precum și a rolului unor bioelemente metalice pentru organismul uman. Efectele biochimice ale unor metale cu potențial toxicogen asupra organismului uman sunt detaliate într-un alt subcapitol.

Capitolul 2, intitulat „Metode analitice și bioanalitice în investigarea metalelor” prezintă date referitoare la unele caracteristici structurale ale metalelor în relație cu activitatea biologică. De asemenea, sunt expuse câteva dintre metodele de investigare ale metalelor din produse biologice, precum și a unor parametrii biochimici sanguini.

Aceste date sunt urmate de aspecte privind modul de prelucrare statistică a rezultatelor obținute în urma determinărilor analitice. În cadrul acestui subcapitol sunt prezentați termeni utilizați în modul de calcul al rezultatelor, criteriile de eliminare a unor date eronate obținute în urma investigațiilor analitice, precum și detalierea evaluării statistice a rezultatelor.

Un alt subcapitol abordează caracteristici experimentale și unele aplicații privind spectroscopia de absorbție atomică. În cadrul acestor date se prezintă unele baze teoretice și aplicații analitice, precum și câteva interferențe care au importanță în obținerea datelor analitice prin metoda spectrofotometrică.

Capitolul 3, denumit „Investigarea oligoelementelor metalice prezente în țesuturi la animale destinate obținerii de produse alimentare” abordează o primă parte de cercetare proprie în domeniul nutriției umane. Astfel se prezintă un subcapitol care cuprinde date privind importanța investigării micronutrienților metalici pentru organismul uman – referindu-se la aspecte din fiziologie și fiziopatologie.

În cadrul tezei s-a urmărit cuantificarea unor biometale și metale cu potențial toxicogen din probe de mușchi prelevați de la bovine și organe prelevate de la bovine și suine. Aceasta parte este detaliată în sensul prezentării modului și condițiile de prelevare a probelor analitice, precum și pregătirea probelor în vederea determinărilor cantitative. Se expun apoi aspecte legate de determinările analitice, vizând tipul de aparate utilizate, precizia acestora, precum și metoda de lucru aleasă cu eventualele particularizări pentru studiul propriu.

Capitolul se încheie cu un studiu al metalelor prezente în mușchi și organe, decelate prin spectroscopia de absorbție atomică. De asemenea, încearcă eventuale explicații referitoare la concentrațiile de metale determinate, făcându-se referire și la diverse date din literatură de specialitate națională și internațională.

Capitolul 4, cu titlul “Cercetări asupra translocării unor oligoelemente metalice la animale de laborator” este partea secundă a cercetării proprii și vizează aspecte de biochimie analitică. Acest studiu a presupus realizarea unui model experimental și astfel se prezintă alegerea speciei pe care se face ulterior studiul – șobolai linia Wistar, condițiile de pregătire a animalelor de laborator și criteriile de instituire a experimentelor și specificul metodologiei experimentale aplicate.

Date referitoare la cercetările experimentale și alegerea oligoelementelor care urmează a fi cercetate din punct de vedere al translocării, precum și procedura administrării compușilor metalici studiați sunt detaliat și explicit expuse în lucrare. Se face mai apoi prezentarea concentrației soluțiilor administrate și a motivării alegerii acestei variante experimentale. De asemenea, se expune modul de prelevare a probelor analitice, condițiile și aparatura utilizată pentru investigațiile analitice, precum și aspectele legate de calculul statistic al rezultatelor obținute.

Teza cuprinde, de asemenea, date privind investigarea unor metaboliți sanguini în relație cu administrarea de compuși metalici, când se urmăresc efectele induse de mangan și zinc asupra unor metaboliți sanguini, precum și asupra unor biometale și metale cu potențial toxicogen din țesut renal prelevat de la animalele de experiență. Datele sunt completate de aspecte analitice citate din literatura de specialitate.

Un ultim subcapitol tratează aspecte legate de efectul oligoelementelor administrate experimental asupra biodisponibilității. Astfel, se prezintă efecte sinergice și antagonice posibile ale mineralelor cu unele biominerale sau metale cu potențial toxicogen, precum și cu alți metaboliți.

În final se expun concluziile studiului întreprins cu detalierea rezultatelor analitice obținute, urmate de bibliografia cuprinzând citările utilizate în cadrul tezei.

1. DISTRIBUȚIA METALELOR ÎN NATURĂ ȘI ÎN SISTEMELE BIOLOGICE

1.1. Considerații generale

Următorii compuși minerali sunt prezenți în organismul plantelor, animalelor și omului în cantități foarte mici. Determinarea, cu exactitate a concentrației acestora prin metodele analitice clasice a ridicat numeroase impedimente cercetătorilor care nu dispuneau la vremea aceea de aparatură performantă. Astfel de compuși minerali au fost descriși ca fiind prezenți “în urme” , de unde s-a și încetățenit expresia și denumirea de elemente “în urme” (în lb. engleză – “trace elements”; în lb. germană – “spurenelemente”; în lb. franceză – “oligoelemente”).

Termenul de “elemente în urme” sau cea mai utilizată expresie este cea în engleză – “trace elements”, este mai des utilizat în ciuda dezvoltării tehnicilor analitice de laborator foarte moderne. Dintre aceste tehnici amintim spectrometria de absorbție atomică (Atomic Absorption Spectroscopy – lb. engleză) și analiza de activare cu neutroni (Neutron Activation Analysis – lb. engleză) care au abilitatea de a măsura toate oligoelementele în cele mai mici probe biologice cu o mare precizie și acuratețe (Johnson și Sauberlich, 1982; Wolf, 1982).

Un oligoelement este considerat esențial atât pentru organismul uman cât și pentru organismul animal dacă îndeplinește următoarele criterii:

- este prezent în toate țesuturile sănătoase;
- concentrația sa de la un organism la altul, pentru aceeași specie, este relativ constantă (prin homeostazia biochimică);
- pentru fiecare specie studiată, cantitatea de element este menținută între anumite limite dacă există integritatea morfologică și funcțională a țesuturilor;
- dacă efectele asupra creșterii, stării de sănătate și fertilității rămân la parametrii optimi;
- carența sau absența oligoelementului produce anomalii fiziologice și/sau morfologice comparative și la fetus (efecte teratogene);
- includerea oligoelementului deficient în dietă previne sau tratează anormalitățile prezente în cazul absenței sau carenței.

Unele oligoelemente sunt cunoscute și îndeplinesc toate criteriile prezentate anterior. Dintre aceste minerale foarte bine cunoscute amintim: fierul, zincul, manganul, seleniul, cromul, cuprul, cobaltul, nichelul, molibdenul și iodul. Majoritatea acestor minerale sunt catalizatori ai multor sisteme enzimatice și de aceea rolul acestora rezidă în proprietatea de a fi cofactor enzimatic la a fi substanțe cu grad înalt de specificitate – cazul metaloenzimelor (Underwood, 1977).

Modul de acțiune și rolul fiecărui mineral ar putea fi clasificat în trei mari categorii (Venchikov, 1974) astfel:

- cu acțiune biologică necesară menținerii unei bune stări de sănătate;
- cu acțiune farmacologică atunci când se utilizează suplimente alimentare în tratarea unor anumite deficiențe minerale;
- cu acțiune toxicologică, cazul în care aportul de mineral depășește necesarul biochimic pentru organismul respectiv.

Conform cercetărilor din domeniu biochimiei, biologiei, fiziologiei și nutriției organismul uman necesită, în principal, prezența obligatorie a 18 vitamine, 21 aminoacizi și 3 acizi grași esențiali și 6 elemente majore: calciu, magneziu, sodiu, potasiu, clor și fosfor. Numărul exact al elementelor esențiale necesare pentru organismul uman este incert, dar cercetările din acest domeniu sunt multiple și prin acestea se încearcă să stabilească esențialitatea acestora. Până nu demult un element a fost considerat "esențial" doar dacă organismul nu putea să se dezvolte sau să-și continue ciclul de viață în absența acestuia și, de asemenea, nu ar putea fi înlocuit de un alt element care să aibă acțiune și rol similar (Bowen, 1966). Însă studiile efectuate pe animale de experiență au demonstrat că în parte unele elemente pot fi înlocuite de altele, și această teorie invalidează definiția anterioară cu privire la esențialitatea unui element.

În urmă cu aproximativ o sută de ani, s-a crezut că organismul uman are în compoziția sa doar 14 elemente: oxigen, hidrogen, carbon, azot, fosfor, sulf, calciu, magneziu, sodiu, potasiu, clor, fluor, siliciu și fier. La acea vreme se credea că organismul uman trebuie să aibă un aport zilnic de aceste elemente, în caz contrar "cu siguranță se va produce o alterare a stării de sănătate".

Oxigenul gazos se știa că intervine în procesul de respirație și a fost recunoscut ca fiind indispensabil. De asemenea, oxigenul în combinație cu hidrogenul se găsește în apă și în mulți alți compuși în care intră și carbonul, azotul și sulful – elemente care sunt componente celulare pentru proteine și alți compuși organici. Fosforul, sub formă de fosfat, a fost considerat ca fiind "sursa fizică a vitalității" și cel mai important element. Alte elemente esențiale cum sunt, sodiul, potasiul, magneziul și clorul au fost găsite în fluidele organismului uman și au fost considerate importante. La acea vreme însă rolul biochimic al acestor substanțe nu au fost pe deplin elucidat.

Calciul a fost văzut pentru prima dată ca fiind componentul principal al scheletului, alături de fluor, deoarece la nivel osos au fost determinate urme din acesta. Siliciul, în mod similar, a fost considerat a fi important în concentrații foarte mici (urme) pentru dinți, unghii și păr. Fierul a fost cunoscut ca fiind necesar în formarea unor componente sanguine încă din secolul XVII, dar a fost clasificat ca fiind esențial doar în prima jumătate a secolului XX. De asemenea, referitor la iod s-a demonstrat că are funcții fiziologice importante încă din 1850, dar a fost recunoscut ca fiind esențial doar în ultimile decenii a secolului XX. Esențialitatea celorlalte elemente a fost demonstrată experimental în anii următori. Astfel, în anul 1950 s-a demonstrat esențialitatea cuprului, manganului, zincului și cobaltului. În anul 1953 a fost demonstrată esențialitatea molibdenului, iar în anul 1957 esențialitatea seleniului. Ulterior siliciu a fost scos de pe lista elementelor esențiale și fluorul a fost de asemenea reluat ca subiect al cercetărilor cu privire la esențialitatea acestuia pentru organismul uman. În anul 1975 cromul, vanadiul și nichelul au fost recunoscuți ca fiind esențiale pentru organismul uman, iar fluorul și siliciu au fost reintroduse pe lista elementelor esențiale (Schrauzer, 1984).

Câțiva ani mai târziu și borul a fost adăugat la lista elementelor esențiale pentru organismul uman (Lovatt și Dugger, 1984). Astfel numărul total al elementelor esențiale pentru organismul uman a fost stabilit ca fiind 15, dar se preconizează că în urma cercetărilor din domeniu acest număr va crește în viitor.

Încă de la mijlocul secolului XX unii cercetători au afirmat că toate elemente care apar în natură, cu excepția gazelor rare și a unor elemente puternic radioactive ar putea avea importanță biologică (Arnon, 1950).

Definiția inițială a esențialității unui element, care recunoștea existența a două categorii de elemente – esențiale și neesențiale – a fost abandonată și de către Schweigart, de la Friedrich-Wilhelm University din Berlin. Acesta, în 1962, a introdus o nouă clasificare care cuprinde patru categorii de elemente (Schweigart, 1962):

1. elemente principale (constituente);
2. elemente integrative (esențiale);
3. elemente facultative (parțial esențiale sau benefice);
4. elemente indiferente (sau negative).

Pornind de la acest sistem de clasificare a elementelor, numeroase substanțe chimice, care inițial au fost ignorate de către cercetători, sunt acum studiate din punctul de vedere al rolului în organismul uman și nu numai.

De asemenea, Manfred Anke (University Friedrich-Schiller – Jena, Germania) pentru a arăta multitudinea de elemente cu rol în nutriție, a propus o dietă compusă doar din amidon de cartof, zahăr, cazeină, uree și ulei de floarea soarelui. La această dietă a determinat cantitatea de vitamine A, E, D₃, și sărurile a 56 de elemente – care de fapt reflectă abundența acestora în natură (Anke et al., 1990). La finea experimentului, caprele hrănite doar cu această dietă propusă, pentru perioade lungi de timp s-au dezvoltat normal și s-au reprodus în condiții foarte bune. Acest fapt demonstrează că a existat un aport echilibrat de principii nutritive esențiale. S-a propus ulterior studierea consecințelor apărute prin îndepărtarea unei substanțe chimice din dieta propusă, deoarece la un moment dat este posibilă apariția unor efecte de-a lungul mai multor generații. De exemplu, îndepărtarea aluminiului, bromului, vanadiului și nichelului determină reducerea perspectivei de viață la copii (Anke et al., 1982; Anke et al., 1990; Arnhold et al., 1993; Anke et al., 1996).

Laptele matern uman conține în mod obișnuit 60 de oligoelemente, inclusiv cantități semnificative de aluminiu, brom, precum și vanadiu și nichel. Prezența acestor substanțe a fost inițial considerată ca fiind suspicioasă, dar apoi s-a sugerat că dacă acestea sunt prezente în mod natural în laptele matern uman, atunci înseamnă că sunt de fapt elemente necesare pentru organismul uman. De asemenea, determinările analitice a elementelor au evidențiat faptul că un număr de 81 elemente sunt regăsite în organism din cele 92 de elemente naturale existente. Nu toate aceste 81 de elemente sunt esențiale sau benefice pentru organismul animal sau uman.

Unele metale și compușii metalici ai acestora se găsesc în materia vie aproape în toate sistemele, fiind reprezentate în proporții diferite în arealul habitual (sol, apă, aer), în produse alimentare de origine animală, produse alimentare de origine vegetală și alte produse alimentare, precum și în organismul uman.

1.2. Distribuția naturală a metalelor – privire sinoptică

În natură se găsesc diverși compuși minerali în cantități și rapoarte diferite, atât în mediul înconjurător, cât și în alimente sau organisme vii. Concentrația acestora diferă în funcție de mai multe criterii, dintre care se pot aminti: compoziția chimică a solului, a aerului, a apei; condițiile climaterice din zona respectivă; distanța până la cel mai apropiat combinat chimic, petrochimic, crescătorii de animale, abatoare; tipul și cantitatea îngrășămintelor folosite pe diferite terenuri agricole; distanța până la cea mai apropiată șosea și traficul de pe șoseaua respectivă, etc.

Plantele, animalele și mai apoi omul reprezintă lanțul trofic al procesului de translocare, cu rol esențial în alimentație, având repercursiuni biomedicale și/sau economice. Distribuția metalelor și a compușilor metalici este un domeniu de vârf, interesând atât biologia vegetală și animală, cât și biologia medicală, mergând chiar până la unele aspecte toxicologice.

Necesarul de substanțe minerale asigură creșterea și dezvoltarea plantelor și a animalelor. Omul prin consumul alimentelor de origine vegetală și animală poate să-și

asigure o stare de sănătate optimă. Condițiile în care se realizează acest aspect sunt diferite și ca atare, eforturile depuse pentru studiul acestora sunt pe măsură.

1.2.1. Distribuția unor metale în mediu

Prezența compușilor metalici în arealul habitual, în speță în regnul vegetal și animal este tributară compoziției chimice a solului, a apei, a aerului sau poate fi urmarea unei poluări – i.e.: concentrarea acestora în mediu peste limitele maxim admise.

1.2.1.1. Distribuția în sol

Din punct de vedere chimic se poate afirma că solul are compoziția chimică foarte diversă și conține totalitatea substanțelor chimice cunoscute. Cantitatea în care aceste substanțe sunt răspândite în sol, poate varia foarte mult de la o zonă geografică la alta.

Solul se găsește în interdependență reciprocă cu atmosfera, hidrosfera și biosfera. Acest fapt explică de ce cea mai mare parte a compușilor chimici trec din sol în aer și / sau apă, apoi în plante, animale și mai apoi în organismul omului (parcursul lanțului trofic). O consecință a acestui fapt este modificarea concentrației substanțelor din sol și apoi din plante. Analog, animalele se hrănesc cu apă și plante – care prin cuantumul de elemente modifică la rândul lor concentrația de elemente din organismul animal. Omul este consumator de apă și produse alimentare de origine vegetală și animală. Deci, carența sau excesul de elemente din apă, plante și/sau animale (și indirect din sol) determină implicit modificarea concentrației din organismul uman.

Cercetătorii, în ultimul timp, și-au îndreptat atenția spre studiul aspectelor legate de compoziția chimică a solului și apariția diverselor boli între care există corelații diverse.

Nu trebuie pierdut din vedere aspectul legat de concentrația unor elemente din sol și starea de sănătate a populației din zona respectivă. Astfel, s-a demonstrat experimental că zonele unde există carențe de anumite substanțe în sol, numărul bolnavilor cu afecțiuni diverse a crescut tocmai datorită carenței de compuși chimici (aceleși care sunt carențați și în sol). Un astfel de exemplu este apariția gușei endemice ca urmare a unui dezechilibru între aport și necesarul organismului, afecțiune înregistrată în zone cu sol sărac în iod. Calciul intervine în acest sens, prin micșorarea absorbției iodului, iar fluorul prin creșterea eliminării iodului.

Organizația Mondială a Sănătății consideră că poluarea solului este consecința unor obiceiuri neigienice sau practici necorespunzătoare. De fapt, poluarea solului este cauza îndepărtării și depozitării neigienice a reziduurilor lichide și solide rezultate din activitatea omului, a dejecțiilor animale și cadavrelor acestora, a deșeurilor industriale sau a utilizării necorespunzătoare în practica agricolă a unor substanțe chimice (fungicide, insecticide, raticide etc.).

De asemenea se discută și problema prezenței metalelor cu potențial toxic de la nivelul solului. Astfel, se încearcă diverse metode de determinare a concentrației acestor elemente care sunt poluante ale solului și care, prin acumulare în organism, duc la probleme grave de sănătate (Drabek O. et al., 2002; Nowak și Kowalska, 2002).

Capacitatea solului de a răspunde nevoilor de creștere și dezvoltare a plantelor poate fi modificată de tratamente agricole, între care fertilizarea solurilor joacă un rol deosebit de important. Fertilizarea solurilor cu diverse substanțe modifică proprietățile fizico-chimice ale solului, și de asemenea schimbă echilibrul ionic. Impactul asupra solului respectiv are două caracteristici importante, și anume: modificarea proprietăților de sorbție și schimbarea acidității solului respectiv. Saturația solului cu complecși ionici suferă

modificări importante și se produce o schimbarea a ratei de utilizare a azotului și potasiului la nivelul solului tocmai datorită substanțelor de fertilizare utilizate (Koper și Piotrowska, 2002; Murawska și Spsychaj-Fabisiak, 2002). În urma diferitelor tratamente de fertilizare a solurilor se produce neutralizarea sau creșterea acidității precum și sorbția sau desorbția cationilor de bază.

1.2.1.2. Distribuția în apă

Apa reprezintă componentul chimic cel mai bine reprezentat în organismele vii, cuantumul acesteia variind între 40-94% în funcție de regn, specie, sex, vârstă etc. Apa fiind constituent al materiei vii este un solvent al principalilor bioconstituenți din mediul intern.

Calitatea apei potabile și a apei în general (apa utilizată pentru irigații, apa de salubritate și igienizare utilizată în industria alimentară etc.) influențează starea de sănătate a populației.

Apa potabilă provine din două surse principale:

- apă potabilă de rețea – din surse naturale, tratată chimic și apoi distribuită în rețea;
- apă potabilă de adâncime (puțuri forate la diverse adâncimi).

Constituenții cei mai nedorți din apa potabilă sunt, fără dubii, aceia care au impact direct asupra sănătății publice și pentru care s-au instituit așa numitele “valori maxime de referință”. Rezolvarea problemei legate de calitatea apei se află în atenția organizațiilor specializate în acest sens. Astfel, în urma diverselor analize de laborator s-au stabilit limite maxim admise atât pentru substanțele care sunt prezente în mod obișnuit în apă cât și pentru substanțele considerate contaminanți ai apei potabile.

Concentrația unor substanțe organice sau anorganice din apă, care poate afecta negativ consumatorii, depinde de factori geologici, ambientali, precum și considerente sociale, economice și culturale. Având în vedere aceste circumstanțe este nepotrivită stabilirea unor “valori maxime de referință” pentru diverse substanțe care afectează proprietatea de acceptabilitate a apei de către consumatori, dar care nu are relevanță directă în raport cu sănătatea populației.

Aspectele legate de dozele acceptabile pentru substanțele anorganice din apă sunt variate, dar se impune precizarea faptului că aceste valori nu sunt valabile în toate cazurile. Astfel, pot apărea probleme la concentrații mai mici sau mult mai mari, depinzând de circumstanțe locale și de caracteristicile fiecărui individ.

Sub acest aspect se știe că în funcția cordului calciul și magneziul au deosebită importanță. Astfel, magneziul este implicat în automatismul cardiac, iar carența de calciu conduce la aritmii și la modificări ale electrocardiograamei.

Referitor la calitatea apei potabile, s-au inițiat diverse studii epidemiologice în SUA urmărindu-se relația dintre apa de băut și bolile cardiovasculare. Interesantă a fost relația dintre mortalitatea datorată bolilor cardiovasculare și calitatea apei de băut în peste 100 de orașe. Rezultatele obținute au fost statistic semnificative, arătând că în orașele în care apa avea carențe în săruri minerale de calciu și magneziu, mortalitatea prin boli cardiovasculare era mult crescută. S-a stabilit astfel o corelație inversă între duritatea apei – concentrația în săruri de calciu și magneziu – și bolile cardiovasculare (fig. 1-1).

Organizația Mondială a Sănătății (World Health Organization – WHO, prin Bulletin of the WHO, 1991, Vol. 69, no. 5) a inițiat un studiu internațional în diferite zone ale lumii, pornind de la calitatea apei potabile. Acest studiu urmărea distribuția substanțelor minerale în apa potabilă și în organismul persoanelor sănătoase și bolnave sau decedate datorită unor boli cardiovasculare. Concluziile acestui studiu au arătat că alături de calciu și magneziu, pot fi implicate în etiopatogenia acestor boli și alte substanțe minerale.

Cercetări privind acțiunea metalelor asupra aparatului cardiovascular au fost efectuate, experimental, și asupra altor metale. Astfel cadmiul s-a dovedit a induce tensiune arterială la animale de laborator, influențând metabolismul colesterolului cu depunerea acestuia pe vasele sanguine și favorizarea instalării aterosclerozei. Mecanismul de acțiune se pare că este de natură enzimatică. De asemenea, strâns legată de acțiunea cadmiului, este și efectul zincului, dar în sens invers, adică scade tensiunea arterială la animale de laborator.

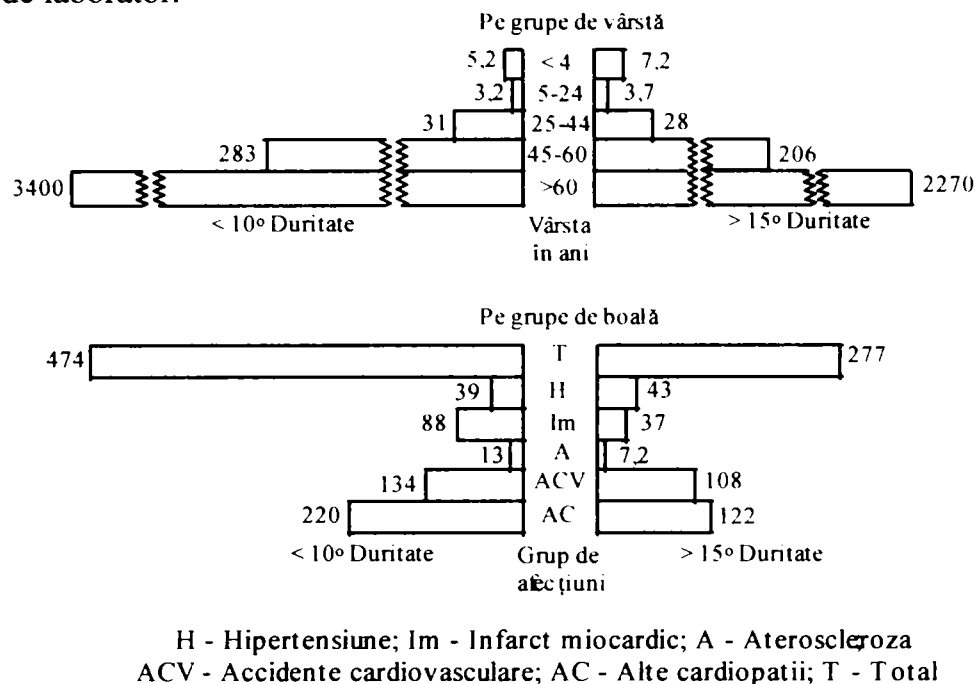


Fig. 1-1. Relația dintre duritatea apei și bolile cardiovasculare (Mănescu et al., 1994)

La noi în țară, calitatea apei potabile de rețea și apei de adâncime este urmărită în raport cu datele publicate în Monitorul Oficial prin Legea 458 / 2002 pentru apa de rețea și STAS 1342 / 31 pentru apa de adâncime (provenită din foraje) – tabel 1-1.

Substanțele indizirabile prezente în apă sunt substanțe care nu au efecte nocive, dar care prin prezența lor modifică caracterele organoleptice astfel încât influențează potabilitatea apei.

Cea mai mare parte a elementelor indizerabile au origine naturală în apă, iar limita acestora de recunoaștere este caracterizată de două nivele de concentrație:

- concentrația admisă – definită ca fiind concentrația până la care apa nu produce nici un inconvenient;
- concentrația admisă excepțional – cazul în care nu poate fi modificată calitatea apei prin tratare (cazul apei de foraj).

Apele reziduale deversate necontrolat au importanță sanitară deosebită, fiind bogate în substanțe chimice diverse și germeni patogeni. Astfel calitatea apei se poate discuta sub două aspecte și anume: răspândirea și diseminarea în mediu a germenilor patogeni și aspectul toxicologic – determinat de conținutul în substanțe chimice cu potențial toxic (Nash, 1993). Acest fapt este prezentat și în publicațiile unor organizații internaționale (World Human Organization, 2000).

Contaminanții chimici ai apei potabile sunt prezenți alături de alte substanțe și compuși anorganici și organici. Valorile de referință au fost calculate separat pentru fiecare substanță, fără a se insista asupra posibilelor interacții a fiecărei substanțe cu alți compuși prezenți în apă. Totuși, limitele mari prezentate pentru fiecare substanță cu posibil rol contaminant are în vedere eventuala interacție cu alți compuși.

Tabel 1-1. Limitele maxime admise pentru apa potabilă tratată de rețea normate în România (M.O. Legea 458 / 2002 pentru apa de rețea și STAS 1342 / 91 pentru apa de adâncime provenită din foraje)

<i>Compuși anorganici prezenți în apa potabilă</i>	<i>Limitele maxime de referință</i>
Aluminiu	0,2 mg / dm ³
Arsen	0,01 mg / dm ³
Cadmiu	0,005 mg / dm ³
Calciu	-
Crom	0,05 mg / dm ³
Cupru	0,1 mg / dm ³
Duritatea totală a apei	Minim 5
Fier	0,2 mg / dm ³
Magneziu	-
Mangan	0,05 mg / dm ³
Mercur	0,001 mg / dm ³
Nichel	0,02 mg / dm ³
Plumb	0,01 mg / dm ³
Seleniu	0,01 mg / dm ³
Sodiu	200 mg / dm ³
Uraniu	-
Zinc	5 mg / dm ³

* Notă: unde apare “ - ” nu este normat de lege.

Cu privire la condițiile sanitare ale apei potabile din diverse regiuni ale globului au fost inițiate numeroase proiecte care și-au propus să depisteze unele probleme existente în zone geografice diferite unde sursele de apă potabile sunt limitate. Astfel, spre exemplu “Water, Sanitation and Hygiene Monitoring Project” (WaSHMP, No. 2, 17 Sept 2003), inițiat în iunie 2002, studiază criza de apă din 643 comunități din totalul de 708 definite de către Statisticile din Palestina (Palestinian Central Bureau of Statistics – PCBS). Proiectul urmărește inițierea unei strategii manageriale prin care să găsească noi surse de apă potabilă și să asigure parametrii de calitate optimă.

Cu privire la contaminarea apei se poate discuta și despre existența unui aspect economic. Aceasta rezidă în distrugerea parțială a florei și faunei acvatice, îndeosebi a peștifor care sunt foarte sensibili la oxigen sau la prezența altor poluanți în apă. În majoritatea țărilor poluările acvatice sunt, din păcate, relativ frecvente și pagubele înregistrate sunt importante.

Un alt aspect legat de calitatea apei are importanță ecologică. Apele reziduale cu conținut ridicat de substanțe organice ușor oxidabile, determină un consum accelerat de oxigen. Astfel procesele biochimice aerobe nu mai pot avea loc și ca atare dezvoltarea normală a organismelor acvatice este grav perturbată. Mecanismele de autopurificare sunt aproape stopate de poluarea persistentă în timp.

În ultimii ani s-au efectuat diverse experimente pe animale de laborator care urmăresc punerea în evidență a potențialului cancerigen al unor substanțe poluante. O astfel de instituție internațională este Agenția Internațională de Cercetare a Cancerului (International Agency for Research on Cancer – IARC). Între substanțele studiate s-au inclus compuși organici – spre exemplu hidrocarburi policiclice aromatice, derivați organo-clorurați, etc. și compuși anorganici – spre exemplu: azotați, azotiți, metale grele: Cd, Hg, Sn, Pb, etc.

În general metalele cu acțiune nocivă, numite cu termen generic metale cu potențial toxicogen, sunt studiate în biochimie și patobiochimie, în nutriție și toxicologie. Astfel, se au în vedere efectele teratogene, mutagene și cancerigene.

Din aceste considerente se urmărește și quantumul acestor metale – alături de alte elemente metalice și metaloizi – din apa potabilă. În toate țările există norme care reglementează calitatea apei potabile. În acest sens se vor prezenta câteva date cu privire la unele substanțe anorganice prezente uneori în apă și limitele maxime de referință utilizate în analiza calitativă a apei potabile (tabel 1-2).

Tabel 1-2. Limitele maxime de referință pentru unele substanțe regăsite în apa potabilă valabile pentru țările din vestul Europei (după Guidelines for drinking-water quality, WHO 1993)

<i>Compuși anorganici</i>	<i>Limitele maxime de referință</i>	<i>Observații</i>
Aluminiu	0,200 mg / L	5% din aportul total este din apa potabilă.
Argint	Nespecificat	Aportul zilnic pentru un adult este estimat la 7μg.
Arsen	0,010 mg / L	Aportul provizoriu zilnic maxim tolerat de organismul uman este de 2 μg/Kg greutate corporală.
Cadmiu	0,003 mg / L	Aportul zilnic oral de cadmiu se apreciază a fi 10–35μg, iar fumatul este o sursă importantă de cadmiu.
Crom	0,050 mg / l	Concentrația totală de crom din apă de obicei nu depășește 2μg/l.
Cupru	2,000 mg / L	Aportul din alimente este de 1–3 mg/zi.
Fier	Nespecificat	În apa potabilă 2 mg / l fier nu reprezintă un pericol pentru sănătate.
Mangan	0,500 mg / L	Aportul zilnic din alimente pentru adulți este de 2 – 9 mg.
Mercur	0,001 mg / L	Aportul provizoriu zilnic maxim tolerat de organismul uman este de 3,3 μg/Kg greutate corporală.
Molibden	0,070 mg / L	Se recomandă un aport de 0,1 – 0,3 mg / l.
Nichel	0,020 mg / L	Media zilnică a aport de nichel este de 0,1–0,3mg nichel, dar poate ajunge la 0,9 mg/l.
Plumb	0,010 mg / L	Copii și tinerii absorb de 4–5 ori mai mult Pb decât adulții.
Sodiu	Nespecificat	Concentrația de sodiu a apei potabile este mai mică decât 20mg/l.
Zinc	Nespecificat	Apa potabilă conține zilnic sub 3 mg/zi zinc.

În Marea Britanie există specificări cu privire la nivelul maxim de mangan pentru apa potabilă, apa minerală și apa îmbuteliată fiind de 50 μg / L, iar aportul maxim de mangan din alimente nu este stabilit (The Natural Water, Spring Water and Bottled Drinking Water Regulations, 1999 and The Private Water Supplies Regulations 1991).

Apa minerală potabilă contribuie semnificativ la aportul de mangan pentru organismul uman (Guidelines for drinking-water – WHO, 1993 și 1996). De asemenea,

există situații în care zincul din apa potabilă are efecte nedorite și anume atunci când concentrația de zinc din apă este între 675 ppm și 2280 ppm (Stokinger, 1981b).

Apa rămâne însă un nutrient absolut necesar, fără de care organismele vii nu ar putea exista, dar totodată și o cale posibilă contaminare a alimentelor și implicit de acțiune poluantă directă asupra organismelor vii.

1.2.1.3. Distribuția în aer

Aerul, din punct de vedere teoretic, este un amestec de oxigen și azot cu un raport de 1 : 4. În realitate, aerul este un amestec de gaze format din azot (78,09%), oxigen (20,95%), argon (0,93%), bioxid de carbon (0,03%) și alte gaze cum ar fi: xenon, neon, kripton, radium, ozon, vapori de apă în procent de 0,03-0,04%. La acestea se adaugă pulberi, polen, bacterii, fungi ș.a., toate în cantități variabile (procentele prezentate diferă în funcție de autor).

În general pulberile sau suspensiile din aer se află dispersate sub formă de particule solide sau lichide. Acțiunea particulelor în suspensie asupra organismului uman și agresivitatea acestora depinde de trei particularități caracteristice (Mănescu et al., 1996):

- concentrația acestora în atmosferă – principalul element caracteristic;
- dimensiunile particulelor în suspensie – determină nivelul până la care acestea pătrund în aparatul respirator (pulmon);
- natura chimică a substanțelor din care sunt alcătuite suspensiile – determinând tipul de efect nociv.

Dacă se face o clasificare a diversilor poluanți prezenți în natură trebuie amintit faptul că există trei clase distincte de poluanți:

- poluanți fizici;
- poluanți chimici;
- poluanți biologici.

Cu privire la relația dintre nutrienți și contaminanții chimici se poate accepta o clasificare a contaminării chimice în contaminare deliberată și contaminare ilicită (Gârban, 2000). Astfel, în grupa contaminanților chimici utilizați deliberat în produsele alimentare (cunoscute și ca aditivi alimentari) se înscriu diverși coloranți, conservanți, antioxidanți, edulcoranți și alți aditivi. Aceste substanțe sunt reprezentate și de compuși care pot conține diverse elemente metalice (exemplu: clorofila, sărurile acidului acetic, acidului propionic, acidului ascorbic; azotați și azotiți de sodiu și potasiu; etc.).

Din punct de vedere al acțiunii nocive asupra organismului uman, elementele metalice se pot clasifica astfel:

- cu acțiune toxică specifică – datorată pulberilor care pătrund în organism și provoacă o intoxicație cu mecanism fizico-patologic, cu tablou clinic și aspect anatomo-patologic caracteristic, indiferent de calea de pătrundere (în special plumbul, cadmiu și mercurul sau compușii acestuia, dar și alte elemente metalice);
- cu acțiune cancerigenă – ca urmare a inhalării unor pulberi anorganice (spre exemplu: compuși cu arsen, crom, nichel; azbest – care provoacă azbestoze sau pneumoconioze etc.);
- cu acțiune iritantă – care poate fi produsă de orice suspensie din aer și care poate produce fenomene de inflamație aseptică la nivelul aparatului respirator sau poate să suprasolicite mecanismele de “clearance” pulmonar. Intensitatea fenomenelor iritative depinde de natura și concentrația pulberilor.

Poluanții toxici prezenți în aer au efecte negative asupra diferitelor organe și sisteme ale organismului uman. Astfel de compuși derivă în general din procese industriale și de la mijloacele de transport. Dintre aceștia o deosebită atenție o prezintă plumbul, cadmiul și mercurul, deoarece substanțele metalice menționate se cumulează atât în mediu, cât și în organismul uman.

1.2.2. Distribuția metalelor în diverse produse alimentare

Exploatarea intensivă, necorespunzătoare a resurselor naturale poate duce la scăderea cantității disponibile de elemente. Reducerea în cantități importante a conținutului de elemente al alimentelor poate apărea și prin prelucrarea culinară sau prin procesarea industrială a produselor alimentare de origine vegetală și animală.

Distribuția naturală a unor oligobioelemente în produsele alimentare prezintă o mare variabilitate fiind dependentă de:

- zona în care s-au cultivat plantele sau zona în care au crescut animalele de la care provine alimentul respectiv;
- solul din care se face preluarea unor ape care ulterior devin surse de apă potabilă sau cu care se fac irigații și se hrănesc animalele;
- tehnologia de procesare a alimentului, precum și materiile auxiliare utilizate;
- locul și condițiile de depozitare a alimentelor; umiditatea, temperatura și prezența unor substanțe chimice sau a unor radiații;
- modul de procesare al produsului alimentar respectiv (concentrat, deshidratat, natural, în soluție etc.), dar și alte aspecte care nu au fost amintite aici.

În mod sigur alimentația influențează cuantumul elementelor din organism. Astfel se apreciază faptul că în domeniul nutrițional, dar și medical, se observă utilizarea anumitor suplimente alimentare care au rolul de a diminua, în general carența unor substanțe din organism.

1.2.2.1. Distribuția în produse alimentare de origine vegetală

Substanțele chimice au o distribuție largă în regnul vegetal, respectiv în diverse produse de origine vegetală. Astfel, se pot avea în vedere cerealele, legumele, fructele și algele.

În dietă distribuția elementelor se poate discuta atât din punct de vedere al bioelementelor, cât și din punct de vedere al elementelor cu potențial toxicogen.

Trebuie precizat faptul că aportul de elemente nu influențează numai cantitatea electroliților din organism, dar intervine și asupra concentrației de metaboliți proteici, lipidici și glucidici. Acest fapt este explicat de salifierea unor compuși din aceste clase în cursul proceselor metabolice.

De asemenea, cuantumul de substanțe din dietă este influențat de distribuția naturală a acestora în materiile prime, de pierderile din cursul preparării sau procesării alimentelor, precum și de fortifierea alimentelor cu diverse vitamine și / sau elemente cu caracter cationic sau anionic.

Dintre produsele alimentare de origine vegetală bogate în oligoelemente amintim mai multe grupe de alimente, cum ar fi: cerealele, legumele, fructele, și după unii autori și algele marine și cele de apă dulce (Șerban și Roșoiu, 1992).

În general, cerealele au conținut semnificativ de elemente chimice îndeosebi în embrion și în straturile de înveliș – care din păcate se elimină prin decorticarea cerealelor. În procesul de măcinare a grâului rezultă făină albă, făină semi, făină neagră și tărâțe. În ultimul timp unii producători fabrică pâine îmbunătățită cu cereale sau chiar cu tărâțe care

are calități nutriționale deosebite. Acest fapt se explică tocmai datorită învelișului exterior al cerealelor în care se găsesc majoritatea substanțelor nutritive de natură minerală: fosfor, potasiu, calciu, magneziu, dar și o serie de vitamine cu rol deosebit de important în nutriție. Tabelul 1-3 prezintă cuantumul unor metale în diverse produse cerealiere (Mogoș, 1997).

Tabel 1-3. Concentrația unor bioelemente cu caracter cationic în cereale (mg/100g)

Specificare produs	Na	K	Mg	Fe	Zn
Pâine albă din grâu	360-500	120	30	0,7	0,74
Făină de grâu	1	350	60	2,0	-
Orez	4	200	30	1,3	-

Dintre substanțele prezente în cereale amintim: fosforul, potasiul, calciul, magneziul etc. Un rol nutritiv deosebit are fosforul, acesta fiind bine reprezentat mai ales sub forma acidului fitic și a sărurilor sale – fitații. Sub acțiunea enzimei specifice (i.e.: fitaza), fitații sunt hidrolizați, eliberându-se în final acidul fitic. Acidul fitic la rândul său poate forma săruri insolubile cu unele elemente minerale (e.g.: calciu și magneziu), care reduc utilizarea digestivă a acestor elemente, eliminându-se prin fecale și astfel neputând fi asimilate de către organism.

Importanța acestor factori antimineralizați prezenți în mod natural în unele produse alimentare reiese și din tabelul 1-4 care prezintă cuantumul fierului și fitatului din unele cereale, precum și câteva date legate de biodisponibilitatea fierului (MOST – The USAID Micronutrient Program – Improving Iron Status through Diet, 1997).

Tabel 1-4. Conținutul de fier, fitat și biodisponibilitatea fierului în diverse cereale (greutate uscată)

Specificare	Fitat (mg/100g)	Fe (mg/100g)	Fitat/Fe Rație molară*	Biodisponibilitatea Fe (%)	Biodisponibilitatea Fe (mg/100g)	Energie (Kcal/100g)
Porumb integral	800	3	25	3,7	0,1	362
Porumb negerminat	72	1	6	5	0,05	364
Grâu integral	800	3,3	23	5	0,16	339
Făină albă (grâu)	280	1,2	20	20	0,24	364
Orez integral	500	1,6	26			360
Orez decorticat	255	0,8	27	3	0,02	363
Sorg integral	618	4	13	3	0,12	332
Sorg decorticat	439	4	9			332
Mei integral	870	8	9			361
Mei decorticat	609	8	6			361

* Fitat (g) / 660 ÷ Fe (mg) / 56

Conținutul de minerale din produsele alimentare este influențat și de prezența altor substanțe. Dintre acestea un rol foarte important îl au substanțele antinutritive care acționează negativ asupra biodisponibilității unor minerale. Dintre acestea amintim acidul fitic, acidul citric, acidul oxalic.

De asemenea, foarte important în ceea ce privește conținutul în substanțe minerale este modul de prelucrare al cerealelor. Acestea în majoritatea cazurilor sunt supuse diverselor operații de măcinare și de sortare pe dimensiuni. Dintre cerealele cele mai

utilizate în scopul obținerii de făinuri cu aplicații în industria alimentară amintim grâul. Acesta se macină în făină, iar gradul de extracție, respectiv de măcinare și sortare (prin trecere peste diverse site) este hotărâtor pentru compoziția chimică. În continuare se va prezenta compoziția în unele elemente a grâului aflat sub diverse forme (boabe, făină de grâu, germeni de grâu, tărațe de grâu) – Tabel 1-5.

Tabel 1-5. Influența măcinării grâului asupra conținutului de minerale (Miller, 1996).

Specificare substanțe minerale	Boabe de grâu (mg/100 g)	Făină albă de grâu (mg/100 g)	Germeni de grâu (mg/100 g)	Tărațe de grâu (mg/100 g)	Pierderi la măcinare (%)
Fier	4,3	1,1	6,7	4,7-7,8	76
Zinc	3,5	0,8	10,1	5,4-13,0	78
Mangan	4,6	0,7	13,7	6,4-11,9	86
Cupru	0,5	0,2	0,7	0,7-1,7	68
Seleniu	0,06	0,05	0,11	0,05-0,08	16

Din datele prezentate în tabelul 1-5 se observă că grâul pierde foarte multe substanțe minerale prin măcinare (exemplu: conținutul de fier în bobul de grâu este 4,3 mg / 100 g grâu față de 1,1 mg / 100 g în făina albă de grâu; conținutul de zinc este 3,5 mg / 100 g grâu față de 0,8 mg / 100 g în făina albă de grâu, etc.). De asemenea, se observă concentrația mare de substanțe minerale din germenii de grâu, comparativ cu boabele de grâu și cu făina de grâu. Tărațele comparativ cu boabele de cereale și cu făina au valoare nutrițională deosebită prin conținutul ridicat de substanțe minerale, dar și prin conținutul de fibre alimentare cu rol deosebit în procesul de digestie (favorizează peristaltismul intestinal).

Legumele sunt alimente de origine vegetală cu o largă utilizare alimentară, oferind un aport important de substanțe minerale. Tabelul 1-6 prezintă cuantumul unor oligoelemente metalice în anumite legume utilizate în prepararea anumitor diete (Mincu, 1993; Mogoș, 1997; Neamțu, 1997).

Tabel 1-6. Concentrația unor bioelemente cu caracter cationic în legume (mg/100g parte edibilă)

Specificare produs	Na	K	Mg	Fe	Zn
Ardei gras verde	-	186	-	0,6	-
Cartofi maturi	20	510	27	1,0	0,27
Castraveți	15	170	9	0,3	0,28
Ceapă uscată	25	106	8	1,0	-
Conopidă	10	420	17	1,0	0,24
Fasole verde	40	275	35	1,0	-
Mazăre boabe	-	340	40	2,0	0,71
Morcovi	100	220	15	1,0	0,20
Roșii	25	310	20	0,6	0,11
Salată verde	2	320	40	2,0	-

Astfel, se poate observa faptul că anumite oligoelemente sunt predominante: calciul se găsește în cantități mai însemnate în legumele cu frunze și păstăioase, bulbi și rădăcini (ex. varza, conopida, ceapa, pătrunjel, fasolea verde, etc.); potasiul se găsește în general, în proporție mai mare decât sodiul în legume; fierul se găsește mai ales în legumele verzi (spanac, pătrunjel, urzici).

Se poate face precizarea că legumele sunt surse importante de cationi în “regimurile alcalinizate”. Dezavantajul în acest caz este reprezentat de faptul că legumele conțin cantități importante de acid oxalic, acid fitic și alte substanțe antiminerilizante, care inhibă absorbția calciului și predispune la formarea de oxalați sau fitați, iar în final determină scăderea calcemiei.

În acest sens se prezintă quantumul fierului și fitatului din unele leguminoase, precum și câteva date legate de biodisponibilitatea fierului – tabel 1-7 (MOST – The USAID Micronutrient Program – Improving Iron Status through Diet, 1997).

Tabel 1-7. Conținutul de fier, fitat și biodisponibilitatea fierului în diverse leguminoase (greutate uscată)

Specificare	Fitat (mg/100g)	Fe (mg/100g)	Fitat/Fe Rație molară*	Biodisponibilitatea Fe (%)	Biodisponibilitatea Fe (mg / 100g)	Energie (Kcal/100g)
Soia	2322	2,8	70	1,7	0,05	403
Fasole neagră	617	2,9	18	0,8	0,02	127
Linte	358	3,3	9	1,2	0,04	116

* Fitat (g) / 660 ÷ Fe (mg) / 56

În fructe se găsesc, de asemenea, importante cantități de săruri minerale, în special săruri de potasiu (Segal, 2002). Calciul și fosforul se găsesc în cantități mici, dar într-un raport optim pentru asimilarea de către organismul uman. Fierul este prezent sub formă de compuși ușor asimilabili, ceea ce favorizează absorbția sa în organism, însă procesul este potențat în prezența acidului ascorbic și al bioflavonelor.

Tabelul 1-8 prezintă concentrația principalelor elemente metalice din fructe, altele decât fructele oleaginoase. (Mincu, 1993; Mogoș, 1993; Neamțu, 1997).

Tabel 1-8. Concentrația unor bioelemente cu caracter cationic în fructe (mg / 100 g parte edibilă)

Specificare produs	Na	K	Mg	Fe	Zn
Banane	4	380	42	0,4	0,16
Caise	3	320	12	0,4	0,11
Căpșuni	2	-	13	0,8	0,13
Cireșe	3	280	15	1,8	-
Lămâi	3	170	13	0,6	0,06
Mere	3	120	5	0,4	0,04
Pere	2	130	10	0,2	0,12
Piersici	3	260	8	0,4	0,14
Prune	3	300	10	0,5	0,21
Zmeură	3	220	10	1,2	-
Struguri	2	300	14	0,5	0,05
Vișine	3	290	20	0,8	0,10

Dintre elementele minerale care se găsesc în quantum ridicat în fructe amintim: potasiu, calciu, mangan, fosfor și fier. Se menționează faptul că în fructe concentrația de sodiu este foarte scăzută. Astfel, fructele pot fi recomandate cu prioritate pentru dietă în regimurile hiposodate. Prin quantumul ridicat de apă și potasiu acestea au acțiune diuretică.

În general, se poate aminti faptul că alături de bioelemente, fructele au un conținut mai ridicat în substanțe tanante (afinele, gutuile) sau în pectine (merele) care ajută bolnavii cu diaree (limitând mișcările peristaltice intestinale).

Există unele fructe bogate în “substanțe de balast”, terminologie care face referire la fibrele alimentare (bogate în celuloză, hemiceluloză, lignină etc.), care au efect invers – efect laxativ, fiind recomandate în anumite forme de constipație.

În tabelul 1-9 se prezintă cantumul unor elemente metalice (sodiu, potasiu, magneziu, fier și zinc) al câtorva fructe oleaginoase (compilare după Mincu, 1993; Mogoș, 1993; Neamțu, 1997).

Tabel 1-9. Concentrația unor bioelemente cu caracter cationic în fructe oleaginoase (mg/100g parte edibilă)

Specificare produs	Na	K	Mg	Fe	Zn
Arahide	4	680	180	2,3	-
Alune fără coajă	4	-	-	-	-
Nuci	4	450	134	2,1	-

În general, fructele furnizează un aport caloric redus, de aceea sunt recomandate în cure de slăbire. O dietă care să concentreze aceste principii nutritive din fructe se poate face cu sucurile de fructe și legume cu rol deosebit de benefic în nutriție. Astfel, în continuare tabelul 1-10 prezintă conținutul în principalele elemente metalice a unor sucuri de fructe (RDA – “Human Nutrition”, Microsoft Encyclopedia 1993-1997).

Tabel 1-10. Concentrația unor elemente cu caracter cationic în unele sucuri de fructe (mg / 200 mL)

Specificare	K	Ca	Fe	Mg	Zn	Na
Suc de citrice	273,7	21,0	2,8	15,7	0,1	7,4
Suc de mere	295,1	17,4	0,9	7,4	0,1	7,4
Suc de morcovi	689,1	56,6	1,1	33,0	0,4	68,4
Suc de roșii	534,6	21,9	1,4	26,7	0,3	877,2
Suc de struguri	330,0	22,5	0,6	25,0	0,1	7,5

Cercetările efectuate în ultimul timp arată că sursa principală de proteine, vitamine și săruri minerale a viitorului este dată de algele marine și cele de apă dulce. Animălele și plantele care trăiesc în mediul acvatic își selectează singure elementele minerale necesare din punct de vedere nutritiv. Însă alături de bioelemente, aceste organisme pot să cumuleze cantități impresionante de metale cu potențial toxicogen provenite din deșeuri deversate în apă (spre exemplu: plumb, mercur, etc.). Oceanul, mările și lacurile conțin aproximativ 3,5 % compuși anorganici dizolvați în apa acestora.

În cadrul unor studii efectuate de către diverși cercetători, s-a demonstrat faptul că algele au un conținut bogat în substanțe minerale (tabel 1-11).

Tabel 1-11. Concentrația unor metalice în alge marine (Afzal Rizvi M.; Shameel M., 2001)

Specificare element	Na (mg/g)	K (mg/g)	Ca (mg/g)	Cd (μg/g)	Co (μg/g)	Cr (μg/g)
Concentrația	13,12	11,65	42,42	0,39	1,10	1,27

Analiza biochimică a plantelor ne arată că algele sunt singurele organisme care pot furniza "hrană organică", din substanțe anorganice. Mineralele pe care algele le absorb din apă în cantități mari, sunt prezente în stare coloidală organică, ușor utilizabilă și direct transmisibile corpului uman.

Datorită faptului că algele sunt organisme care absorb substanțele prezente în apa mărilor și oceanelor, un mediu contaminant determină implicit contaminarea acestora. În general flora și fauna marină, iar mai departe prin ingerarea acestora ca hrană – ajung în organismul uman unde pot duce la grave intoxicații imediate sau prin cumulare. În ultimile decenii apa mărilor și oceanelor a devenit nu de puține ori locuri de deversare a deșeurilor, tocmai din acest motiv se impune testarea riguroasă a produselor alimentare provenite din mediul acvatic (Șerban și Roșoiu, 1992).

1.2.2.2. Distribuția în produse alimentare de origine animală

Cu referire la elementele metalice și nemetalice, au fost efectuate cercetări experimentale pentru a elucida acțiunea acestora asupra metabolismelor în organismele omului și animalelor. În acest sens în literatura de specialitate există numeroase studii în domeniul biochimiei, nutriției și toxicologiei, cu aplicații în medicina umană, medicina veterinară și zootehniei.

Aproape toți compușii minerali necesari în furajare se regăsesc în produse de origine animală: lapte și produse lactate, carne și derivate, ouă, mierea de albine.

Laptele și produsele lactate se încadrează în grupa produselor alimentare cu valoare biologică ridicată. Datorită, îndeosebi proteinelor și bioelementelor, laptele corespunde cerințelor copilului și adolescentului, favorizând creșterea, dezvoltarea, osificarea, dentiția și toate celelalte procese fiziologice.

Din punct de vedere al compoziției, laptele are cantități relativ reduse de elemente metalice comparativ cu alte principii nutritive, dar prezintă importanță nutrițională prin faptul că se găsesc sub o formă ușor asimilabilă. Tabelul 1-12 prezintă cuantumul unor minerale în lapte și produse lactate ("RDA – "Human Nutrition", Microsoft Encyclopedia 1993-1997).

Tabel 1-12. Concentrația unor biominerale cu caracter cationic în lapte și produse lactate (mg / 100 g produs)

Specificare produs	Na	K	Mg	Fe	Zn
Iaurt	50	160	12	-	-
Lapte integral vacă	50	160	12	0,05	0,38
Smântână	50	110	7	0,20	-
Telemea oaie	2000	150	30	0,60	-
Telemea vacă	2000	150	25	0,40	0,37
Unt	50	14	1	0,20	0,05

Dintre bioelementele prezente în lapte și produse lactate amintim calciul și fosforul – aflate în cantități asemănătoare și în organismul uman. Sărurile minerale din lapte se găsesc sub formă de fosfați (de calciu, potasiu, magneziu), citrați (de sodiu, potasiu, magneziu, calciu) și cloruri (de sodiu, potasiu, calciu).

În tabelul 1-13 sunt prezentate date referitoare la unele produse lactate. Datele au fost compilate din articole de specialitate publicate de "RDA – Human Nutrition", Microsoft Encyclopedia 1993-1997.

642.456
369 E¹⁷

Tabel 1-13. Concentrația unor biominerale din produse lactate (mg / 200 mL).

Specificare	K	Ca	Fe	Mg	Zn	Na
Cacao cu lapte	469,6	281,5	0,8	51,1	1,2	155,8
Cappucino	204,1	124,5	0,2	18,3	0,4	50,7
Ciocolată caldă	479,7	298,3	0,8	55,5	1,2	122,7
Lapte 1% grăsime	382,4	301,4	0,1	33,9	1,0	123,7
Lapte integral	369,7	291,3	0,1	32,8	0,9	119,6

Deși în lapte cantumul substanțelor minerale este scăzut în comparație cu alte componente, acestea au o valoare deosebită deoarece se află sub forme ușor asimilabile. Cantitatea minerale este în medie de 9-9,5g% variind de la o specie la alta, și de asemenea, depinde de perioada de lactație, de hrana animalului etc. Datele analitice privind cantumul de substanțe minerale din laptele de vacă demonstrează că acest aliment este furnizorul principal de calciu și magneziu.

Cuantumul de săruri minerale din laptele de vacă variază și datorită prelucrării tehnologice (e.g.: prin dehidratare). Astfel, laptele integral de vacă și laptele degresat de vacă au aceeași concentrație de săruri minerale, dar aportul caloric este diferit (datorită cantumului de lipide). În cazul laptelui de vacă integral energia furnizată este 63,3 Kcal/100g, pentru laptele degresat este de 39,5 Kcal/100g, iar pentru laptele praf integral este de 489 Kcal/100g. Cuantumul substanțelor minerale din laptele de vacă integral, lapte de vacă degresat și lapte de vacă praf este prezentat în tabelul 1-14.

Tabel 1-14. Date analitice privind cantumul de biominerale a laptelui de vacă (Guthrie, 1975)

Componente	Lapte integral	Lapte degresat	Lapte praf
Substanțe minerale (%)	0,75	0,75	7,00
Biometale mg/100g			
Calciu	128,00	123,00	929,00
Sodiu	47,00	53,00	371,00
Potasiu	155,00	150,00	1150,00
Fier	0,25	0,20	0,70
Zinc	0,35	0,40	4,50
Magneziu	0,003	0,40	-
Cobalt	0,023	0,023	-

Carnea și produsele derivate reprezintă altă categorie de produse alimentare de origine animală importantă pentru aportul de minerale. Astfel, carnea și produsele derivate din carne prezintă un conținut de biominerale care variază între 0,8 și 1,8%, fiind bine reprezentate de fosfor, calciu, fier. Tabelul 1-15 prezintă cantumul unor elemente metalice prezente în anumite produse de carne (Mincu, 1993).

Trebuie amintit faptul că produsele din carne se impun în alimentație prin conținutul și calitatea proteinelor, lipidelor, dar și prin aportul de vitamine și substanțe minerale.

Cele mai importante componente ale cărnii sub raport calitativ sunt reprezentate de țesutul muscular, țesutul adipos, țesutul conjunctiv, țesutul osos și țesutul cartilajinos. Raportul cantitativ între aceste componente poate să varieze în limite foarte largi, în funcție de specie, rasă, stare de îngrășare.

Tabel 1-15. Concentrația unor biominerale din produse de carne și pește (mg/100g produs)

Specificare produs	Na	K	Mg	Fe	Zn
Carne de vită	70	350	25	3,50	6,73
Carne de porc	70	330	25	2,50	-
Carne de oaie	70	350	24	2,70	-
Carne de găină	80	350	28	2,00	-
Ficat vită	70	298	22	12,1	-
Rinichi vită	70	238	-	8,00	-
Cord vită	85	380	40	-	-
Salam de Sibiu	1750	-	-	-	-
Salam de vară	1750	-	-	-	-
Pateu de ficat	1500	-	-	10,00	-
<i>Pește</i>					
Crap	80	300	25	1,50	-
Morun	130	260	-	-	-

Dintre substanțele minerale, în carne, predomină potasiul, fosforul și fierul. În cantități mici se găsesc sodiul și calciul. Carnea conține și serie de microelemente cum sunt zincul, cobaltul, cuprul etc.

Carnea de vită este cea mai importantă sursă de fier ușor asimilabil, 100g carne crudă de vită conținând 2,2 – 3,7 mg fier; carnea de porc crudă 1,0 – 1,4 mg fier, iar carnea de pui crudă conține 0,4 – 0,7 mg fier (Segal, 2002).

Coeficientul de absorbție digestivă al fierului din carnea de bovine în comparație cu fierul din produsele vegetale este de 34 de ori mai mare. Într-o alimentație obținută pe bază de porumb și orez, în care coeficientul de absorbție al fierului este foarte redus, se recomandă să se introducă și carne de vițel (1 / 4 din rație). În acest caz important este faptul că se adaugă fier foarte ușor asimilabil și se dublează coeficientul de asimilare al fierului din rația astfel constituită.

În cazul unor probleme legate de hipertensiunea arterială concomitent cu reducerea aportului de sodiu se va reduce și consumul de lipide, în special lipide saturate – care la rândul lor au acțiune aterogenă și indirect hipertensivă. Substanțele minerale de natură cationică pot reacționa cu lipidele formând săruri. Compușii lipidici care de fapt sunt implicați în această reacție sunt acizii grași, care participă la reacția de saponificare – proprietate recunoscută și caracteristică lipidelor (indicele de saponificare al lipidelor).

În tabelul 1-16 sunt prezentate câteva produse de origine animală, recomandate pentru asigurarea unei nutriții echilibrate, evidențiindu-se compoziția în unele biometale.

Tabel 1-16. Conținutul unor biometale în produse de carne și organe (Steinmassl, 1994)

Element metalic	UM	Carne de vită (macră)	Ficat de vită	Carne de porc (macră)	Ficat de porc
Na	mg / 100g	50,0	116,0	76,0	77,0
K		364,0	292,0	252,0	350,0
Ca		5,0	7,0	5,0	10,0
Mg		20,0	17,0	17,0	21,0
Fe		2,4	7,1	2,2	22,1
Zn		4,1	5,1	2,2	5,9
Cu	μg / 100g	71,0	3600,0	58,0	5480,0
Mn		20,0	250,0	72,0	360,0

Carnea și produsele din carne au un conținut de săruri minerale care variază între 0.8 % și 1.8 %, între care se remarcă cuantumul ridicat de fier – mai ales în unele organe cum sunt splina și ficatul (Mincu, 1993). Bioelementele din carne sunt reprezentate mai ales de fosfor în concentrații de 131 – 213 mg / 100 g și de calciu în concentrații de 5 – 12mg / 100g produs macră).

Există stări patologice în care se impune un regim hiposodat (concentrația de clorură de sodiu din dietă să fie foarte mică). În această categorie de pacienți se include bolnavii care suferă de hipertensiune arterială, afecțiuni renale etc.

Oul reprezintă un alt produs de origine animală, care reprezintă un aliment deosebit, datorită compoziției chimice a acestuia. În coaja oului se regăsesc cca. 95 % substanțe minerale (carbonați de calciu și magneziu, fosfați etc.), 3.3 % substanțe organice și 1.6 % apă.

Conținutul în unele bioelemente al oului de găină integral este de cca. 31 mg calciu / 100 g ou, 116 mg fosfor / 100 g ou, 76 mg potasiu / 100 g, 66 mg sodiu / 100 g ou, 74 mg magneziu / 100 g ou, 74 mg clor / 100 g ou, 27 mg sulf / 100 g ou și 2.3 mg fier / 100 g ou (Mincu, 1993). Din datele prezentate se observă că oul integral este o bună sursă de fier pentru organismul uman. Necesarul de fier pentru un bărbat adult este de 6.5-13,0 mg/zi, pentru o femeie între 6,0-9,0 mg/zi, pentru adolescenți 10,0-20,0 mg/zi, iar pentru copii 4,0-10,0 mg / zi. Astfel, putem afirma că un ou asigură aproximativ un sfert din necesarul de fier pentru un copil mic, fiind astfel deosebit de important pentru prevenirea anemiei feriprive (care apare în carența de fier).

Cercetările din domeniu au arătat că distribuția substanțelor minerale din gălbenuș și albuș, precum și din coaja oului de găină diferă foarte mult (Davis și Reeves, 2002). Aceste diferențe sunt redată în tabelul 1-17 care prezintă conținutul în uni cationi și anioni din oul de găină.

Tabel 1-17. Concentrația unor bioelemente în oul de găină (mg / 60 g ou integral).

Specificare	Na ⁺	Mg ²⁺	P	S	Cl ⁻	K ⁺	Ca ²⁺	Fe ³⁺	Total
Gălbenuș	13	24	110	3	23	21	27	2	223
Albuș	53	3	6	64	51	55	4	urme	236
Coajă de ou	-	20	20	urme	-	-	2210	urme	2250

Unele dintre substanțele minerale (magneziul, fosforul, calciul și fierul) din oul de găină sunt mai concentrate în gălbenuș decât în albuș. Astfel, aproximativ 50% din sulf se găsește în livetină, fosforul în fosfolipide, fierul în gălbenuș, iar calciul este mult mai concentrat în gălbenuș față de albuș (Vizzardi și Maffei, 1996).

Substanțele minerale prezente în ou diferă și în funcție de specie. Astfel, în tabelul 1-18 se vor prezenta câteva date cu privire la compoziția oului integral la mai multe specii de păsări (găină, curcă, rață și găscă).

Tabel 1-18. Caracteristicile compoziției oului integral la mai multe specii de păsări (Mincu, 1980).

Specificare	Ou de găină	Ou de curcă	Ou de rață	Ou de găscă
Masa medie a oului (g)	51,6	71,6	66,6	177
Apă (%)	73,6	73,7	69,7	70,6
Substanță uscată (%)	26,4	26,3	30,3	29,4
Substanțe organice (%)	25,6	25,5	29,3	28,2
Substanțe minerale (%)	0,8	0,8	0,9	1,0

Dintre cele patru tipuri de ouă, oul de găscă este cel mai bogat în săruri minerale – 1,0%. Oul de găină și oul de curcă au aceeași cantitate (exprimată procentual) de substanțe minerale – 0,8%, iar oul de rață este ușor mai bogat în substanțe minerale (0,9%) față de oul de găină și cel de curcă.

Mierea de albine, – este o altă importantă sursă de substanțe minerale. În miere s-au decelat fier, cupru, mangan, calciu, potasiu, sodiu, fosfor, magneziu, siliciu, clor ș.a. Elementele prezente provin mai ales din solul pe care cresc plantele, după care trec în nectarul din care se recoltează apoi polenul de către albine. Astfel, se poate prezenta compoziția mierii de albine în unele minerale: calciu 51,0 mg / Kg; cobalt 1,0 mg / Kg; cupru 1,8 mg / Kg; fier 6,6 mg / Kg; magneziu 33,0 mg / Kg; mangan 1,0 mg / Kg; potasiu 296,0 mg / Kg; zinc 2,7 mg / Kg (Yölmaz și Yavuz, 1999).

Dacă solul și plantele frecventate de albine sunt contaminate cu diverse substanțe minerale nocive, acestea se vor regăsi în produsul final – miere de albine. Totuși sunt recunoscute proprietățile terapeutice ale mierii de albine în parte și datorită compușilor minerali prezenți și de aceea acest aliment se folosește cu precădere la persoanele bolnave și copii.

1.2.2.3. Distribuția în alte produse alimentare

Alte surse de minerale, respectiv macro-, oligo- și microelemente sunt băuturile nealcoolice, apele minerale, ceaiurile, sucurile de fructe și legume, siropurile etc. În unele cazuri se produc băuturi fortificate cu vitamine și minerale.

Apele minerale sunt importante pentru aportul de cloruri, bicarbonați, sodiu, calciu, magneziu, fier ș.a. Sigur că o mare importanță o are sursa sau izvorul de unde s-a făcut îmbutelierea și modul de îmbuteliere a apei minerale.

Ceaiul, cafeaua și cacaoa sunt importante pentru aportul de minerale, iar ceaiul este bine cunoscut ca fiind o sursă importantă de fluor.

Oțetul de mere prin modul de obținere este o bună sursă de minerale. Acest oțet este preferat pentru faptul că este produs prin fermentarea merelor, și nu prin adaos de acid acetic.

Problemele de nutriție în speță carențele în micronutrienți din grupa compușilor minerali apar din cauze variate, între care alimentația bazată pe alimente rafinate sau unilaterală fiind una dintre aceste cauze. Din aceste motive se recomandă fortifierea unor produse cu fier, calciu, fluor și iod. Adăugarea de săruri minerale în produsele alimentare este mai dificilă decât fortifierea cu proteine și vitamine, deoarece această operație afectează calitățile senzoriale ale produselor alimentare.

Fortifierea cu calciu a produselor nu ridică probleme deosebite, însă îmbogățirea cu fier este dificilă deoarece poate înnegri alimentele. Ca surse de fier se recomandă săruri ușor asimilabile, care nu afectează proprietățile alimentului “vector” așa cum sunt sulfatul feros, fierul redus etc. Pe lângă acești compuși menționați mai sus în industria alimentară se mai utilizează fosfatul feros, fumaratul acid de fier, ascorbatul de fier, lactatul și gluconatul de fier (Segal, 2002).

1.2.3. Distribuția metalelor în organismul uman

Indiferent de variațiile aportului de nutrienți reprezentați prin compuși minerali pentru organismul uman, prin dietă se urmărește soluționarea cât mai rapidă și durabilă a carențelor sau exceselor existente. De asemenea, prin homeostazie se realizează menținerea în limite normale a concentrației serice a bioelementelor din organism.

Biomineralele, în general, sunt prezente în organism în proporție de 4 – 5% din greutatea corpului, acestea sunt indispensabile pentru menținerea unei stări optime de sănătate. Rolul fiziologic al diverselor macro-, oligo- și microelemente este definitoriu pentru toate interacțiunile biochimice și procesele fiziologice.

Cuantumul biometalelor din organismul uman diferă calitativ și cantitativ (Weisell, 1992). Astfel, analitic s-au decelat:

- macroelemente metalice, prezente în proporție de cca 99 % (sodiu, potasiu, magneziu, calciu);
- microelemente metalice, prezente în proporție de sub 0,01 %. Acestea se clasifică la rândul lor în trei categorii:
 - esențiale (fier, cobalt, nichel, cupru, zinc, crom, mangan etc.);
 - posibil esențiale (aluminiu, vanadiu, litiu etc.);
 - neesențiale – tolerabile în anumite limite (mercur, plumb, cadmiu, aur, argint).

Procesele dependente de biometalele esențiale sunt deosebit de variate și complexe, fiind dificilă caracterizarea termenului de “esențiale” (Underwood, 1977). Necesarul de bioelemente variază, fiind de ordinul gramelor (g), microgramelor (μg), nanogramelor (ng), părților pe milion (ppm sau mg / Kg sau $\mu\text{g} / \text{g}$), la ordinul părților pe miliard (ppb sau $\mu\text{g} / \text{Kg}$).

Elementele prezente în organismul uman în concentrații egale sau mai mici de 1 mg / kg țesut uscat, sunt considerate “elemente în urme”.

Sărurile minerale ca micronutrienți ai organismului uman se pot prezenta sub forma unor combinații stabile. Forma chimică a acestora este diferită în funcție de rolul biologic al acestora (Mc Neely, 1986).

Cuantumul biometalelor în organismul uman variază în limite largi după cum se prezintă și în tabelul 1-19.

Tabel 1-19. Valorile medii, minime și maxime ale unor biometale prezente în organismul uman (Altman și Dittmer, 1968)

Element mineral	Valori medii (mg/Kg corp)	Valori minime – maxime (mg/Kg corp)
Sodiu	60,00	25,00 – 94,00
Potasiu	54,00	16,00 – 56,00
Calciu	3,30	0,60 – 8,30
Magneziu	1,35	0,42 – 2,40
Fier	0,007	–
Zinc	0,0052	0,0016 – 0,0064
Cupru	0,0005	0,0003 – 0,0007
Mangan	0,0001	0,0014

Pe lângă aceste biometale, în organismul uman pot fi prezente și metale cu potențial toxicogen care pot include efecte teratogene, mutagene sau oncogene. Dintre acestea amintim plumbul (Cocco et al., 1997), mercurul și cadmiul (Vainio, 1997), stronțitul (Anke, 1996) ș.a.

Conform datelor prezentate de Mogoș (1997) în cele ce urmează se prezintă câteva date referitoare la cuantumul seric normal a unor metale (tabel 1-20).

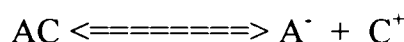
După prezentarea acestor caracteristici se poate observa faptul că se impune necesitatea unui aport optim de minerale prin rația alimentară. Astfel, o alimentație variată

și mixtă – cu alimente de origine vegetală și animală – poate asigura menținerea unui echilibru între necesarul nutrițional și aportul alimentar.

Tabel 1-20. Concentrația serică a unor metale pentru organismul uman.

Elementul mineral	UM	Valori normale
Calciu	mmol / L	2,25 – 2,65
Crom	nmol / L	94,00 – 183,00
Cobalt	nmol / L	7,30 – 8,30
Cupru	μmol / L	10,00 – 20,00
Fier - bărbați	μmol / L	14,00 – 31,00
- femei	μmol / L	11,00 – 30,00
Magneziu	mmol / L	0,70 – 1,00
Mangan (sânge integral)	nmol / L	100,00 – 200,00
Potasiu	mmol / L	3,50 – 5,00
Sodiu	mmol / L	135,00 – 145,00
Zinc	μmol / L	10,00 – 18,00

În organismul uman activitatea biologică este coordonată și influențată de mai mulți factori. Dintre aceștia compușii biominerali se află în proporție de 3-5% și sunt reprezentați predilect de electroliți de tipul AC, care pot disocia în anioni (A⁻) și cationi (C⁺).



Evident în organism există și compuși în care metalele se află chelatizate, e.g.: hemul, citocromii, unele metaloporfirine neporfirine, etc.

Compușii minerali se află în organismul uman atât în stare ionică, cât și în stare neionică, având roluri variate:

- structural: spre exemplu săruri de calciu în compoziția oaselor, dinților; fierul ionic în hemoglobină; cobaltul ionic în structura vitaminei B₁₂;
- catalitic: spre exemplu zincul în activitatea a peste 70 de enzime, având rol structural sau de efector biochimic (activator / inhibitor);
- fizico-chimic: electroliții alături de alți compuși concură la echilibrul acido-bazic, echilibrul osmotic și la procesele electrochimice din membranele biologice, etc.

Distribuția elementelor metalice prezente în organismele vii diferă sensibil de la o specie la alta. O prezentare mai concludentă în acest sens se face în tabelul 1-21 care se referă la rata distribuției unor elemente chimice în scoarța terestră și în organismul uman.

O privire generală asupra bioelementelor prezente în organismul uman relevă faptul că primele patru elemente nemetalice (H, O, C, N) reprezintă 99,4 % din total.

Biometalele prezente în organismul uman reprezintă cca 0,41% din totalul elementelor chimice, față de 24,96% cât este quantumul elementelor metalice prezente în scoarța terestră. Astfel, se poate observa importanța majoră a corelării alimentației cu mediul habitual și starea de sănătate a grupelor de populație (Rannert și Chan, 1981).

În organismul uman și nu numai, se găsesc în special cationi reprezentați de sodiu, potasiu, calciu, magneziu etc.; și anionii cloruri, fosfat, carbonat, sulfat, azotat etc. Acești ioni reacționează cu diverși compuși, formând săruri deosebit de utile în funcționarea optimă a tuturor proceselor care au loc în organismul uman (Rhoades și Pflanzler, 1992).

Tabel 1-21. Distribuția unor elemente chimice în litosferă și în organismul uman (Gârban, 1999)

Scoarța terestră		Organismul uman	
Element chimic	Rata distribuției (%)	Element chimic	Rata distribuției (%)
O	47,00	H	63,00
Si	28,00	O	25,00
Al	9,00	C	9,50
Fe	4,50	N	1,40
Ca	3,50	Ca	0,31
Na	2,50	P	0,22
K	2,50	Cl	0,08
Mg	2,50	K	0,06
Ti	0,46	S	0,05
H	0,22	Na	0,03
C	0,19	Mg	0,01

Dintre principalele clase de compuși (macronutrienți) care interesează nutriția amintim glucidele, lipidele, protidele. Acestea pot reacționa cu sărurile minerale formând compuși macromoleculari. Reacțiile cu formarea acestor compuși pot să se desfășoare în organism și pot să fie obținute pe cale chimică sub formă de produse fortifiante sau suplimente alimentare. Astfel, dintre glucidele din organism care au în compoziție substanțe minerale amintim: gluconatul de calciu și gluconatul magneziu – produse care se utilizează și în nutriția parenterală. Dintre reacțiile lipidelor din organism cu sărurile minerale amintim salifierea acizilor grași cu obținerea de săpunuri. În ceea ce privește protidele în relație cu sărurile minerale amintim aminoacizii chelatați cu diverse substanțe minerale și diverse metaloproteine.

1.3. Acțiunea compușilor minerali asupra diversilor metaboliți

Compușii minețali prezenți în organismul uman sau animal influențează cuantumul sau biodisponibilitatea unor metaboliți. Astfel, se poate discuta efectul produs de prezența unui compus mineral asupra diversilor metaboliți glucidici, metaboliți lipidici, metaboliți protidici, asupra cuantumului de apă, precum și asupra unor electroliți.

Forma chimică și concentrația în care se găsește un bioelement metalic sau un metal cu potențial toxicogen în organismul uman sunt două caracteristici importante în ceea ce privește starea de sănătate a individului respectiv. Un alt aspect care trebuie avut în vedere este prezența altor compuși, cu care substanța minerală poate intra în reacție. Ca urmare a acestor interacții dintre compușii minerali care acced prin alimente și metaboliții din organism se poate produce scăderea sau creșterea concentrației diversilor metaboliți.

În acest sens se prezintă în continuare câteva aspecte legate de influența unor substanțe minerale asupra unor metaboliți glucidici, lipidici, protidici, asupra echilibrului hidric și a altor electroliți (efecte sinergice sau antagonice).

1.3.1. Acțiunea compușilor minerali asupra metaboliților glucidici

Prin compilarea datelor din literatura de specialitate se vor prezenta succint aspecte referitoare la acțiunea unor metale asupra glucidelor și a unor metaboliți glucidici. Pentru a face o prezentare generală se descriu aspecte diverse legate de anumite metale sau grupe de metale asupra unor metaboliți glucidici. Dintre acești metaboliți glucidici, care interesează în mod deosebit studiile și cercetarea biochimică se amintesc: glucoza, acidul lactic și acidul piruvic.

Calciul este un bioelement cu importanță deosebită pentru starea fiziologică a organismului uman și animal. La nivelul organismului asimilarea rapidă a calciului este facilitată de lactoză. Consumul produselor cu conținut ridicat de celuloză determină blocarea unei părți din calciu la nivel intestinal și astfel o parte din calciu devine inabsorbabil. În condițiile în care dietoterapia devine insuficientă, sau în cazul unei depleții severe de calciu, se recurge la terapia medicamentoasă – care presupune administrarea orală, intravenoasă sau intramusculară de calciu gluconic (aceasta se poate include nutriției parenterale).

În cazul dietoterapiei pentru deficiența de cupru, rația alimentară se bazează pe asigurarea unor produse bogate în cupru. Astfel, se preferă produsele alimentare de origine animală – deoarece prezența L-aminoacizilor favorizează absorbția cuprului; pe când produsele de origine vegetală – prin prezența celulozei și a unor cantități mari de acid ascorbic, scade absorbția cuprului. Eficiența terapeutică în cazul unei depleții de cupru se analizează prin efectuarea testului de toleranță la glucoză și activitatea lisil-oxidazei (dacă apar valori scăzute la aceste teste, nu s-a corectat carența de cupru și tratamentul trebuie continuat).

Un alt mineral, mai puțin reprezentat în organismul uman și animal este cromul. Acesta are rolul de a fi cofactor al unor enzime implicate în metabolismul glucidic, lipidic sau protidic și potențează activitatea insulinică. Totuși excesul de crom determină inhibarea activității insulinice. Controlul paraclinic pentru stabilirea cuantumului de crom se face prin determinarea cromului seric, testul de toleranță la glucoză și lipidograma. În cazul deficitului de crom scade toleranța la glucoză, se produce scăderea ponderală, apar neuropatii. Analizele clinice de laborator arată, instalarea hiperinsulinemiei, galactozurie, hiperglicemie à jeun, hipercolesterolemie și hipertrigliceridemie.

În cazul fierului, perturbarea metabolismului general, duce la modificări în funcționarea anumitor aparate și organe. Astfel, acumularea excesivă a fierului în organism produce, în timp, afectarea activității pancreasului – cu instalarea diabetului zaharat. Asigurarea unei alimentații strict vegetariene limitează absorbția fierului datorită conținutului ridicat în celuloză și fitați. De asemenea, excluderea din dietă a produselor de origine animală crește riscul instalării carenței de fier. Totuși, cercetările au demonstrat că alimentele cu conținut ridicat de celuloză determină scăderea biodisponibilității fierului în vederea absorbției, deoarece celuloza și hemiceluloza pot forma compuși chelatici cu fierul. Un alt aspect legat de cuantumul fierului în organism și alimentația este absorbția deficitară a fosfatului feric atunci când zahărul îmbogățit este adăugat la produsele cerealiere, față de folosirea acestuia în prepararea gemului. În cazul în care terapia prin asigurarea unei anumite diete nu este eficientă, se recurge la produse farmaceutice. Administrarea orală sau parenterală se poate realiza cu diverse substanțe dintre care amintim: glutamatul feros (cu 21-22%Fe); gluconatul feros (12%Fe); lactatul feros (19% Fe).

Și în cazul fosforului se amintește faptul că acest bioelement are diverse funcții: intervine în metabolismul glucidic, lipidic și protidic, favorizând acumularea și eliberarea de energie; intervine în absorbția și transportul substanțelor nutritive, etc. Dacă este necesară aplicarea unei restricții fosforice, regimul alimentar va asigura un aport energetic suficient pentru a limita catabolismul endogen și a împiedica creșterea fosfatemiei. Glucidele sunt una

din sursele importante de energie și deoarece depozitarea glucozei se face sub formă de glicogen se "utilizează" o parte din fosforul ambiant, crescând astfel fosfatermia. Scăderea aportului exogen de fosfor este relativ rar întâlnită în practica medicală (e.g.: o dietă bazată exclusiv pe glucoză). Trebuie precizat faptul că între absorbția calciului și fosforului există o strânsă legătură. Diabetul fosfaturic este determinat, în parte, de unele afecțiuni renale ce însoțesc eliminări mari de fosfor prin urină.

Magneziul este un bioelement cu rol de activator al multor enzime implicate în metabolismul protidic, glucidic și lipidic. Există cazuri de patologie biochimică, în care dacă în cazul unor probleme respiratorii se continuă administrarea magneziului, se instalează starea de comă hipotermică însoțită de hiperglicemie și hipocalcemie. Din punct de vedere al dietei administrarea unui regim alimentar alcalinizant, sau a unor alimente bogate în celuloză, hemiceluloză sau pectine determină scăderea absorbției magneziului. În cazul excesului de magneziu dieta va avea o rație alimentară bogată în glucide, care suplinesc deficitul energetic și favorizează trecerea magneziului seric în spațiul intracelular. De asemenea, în cazul în care există o carență de magneziu, se va evita consumul exagerat de glucide, deoarece odată introdus în organism magneziul va pătrunde în celule prin efectul permisiv al insulinei. Consumarea alimentelor ce furnizează exces de fosfor (care crește pierderea urinară de magneziu și scade absorbția intestinală) și exces de calciu (care blochează prin competiție absorbția magneziului) și exces de fibre vegetale (celuloză, hemiceluloză) scad biodisponibilitatea magneziului.

În cazul unui exces de sodiu, pe lângă alte modificări majore legate de creșterea osmolarității sau a hemoglobinei, apare și o ușoară creștere a glicemiei – fapt care depinde de gradul de hidratare al organismului. În general, sodiul este un mineral bine reprezentat în marea majoritate a alimentelor. O dietă cu un aport redus de sodiu poate determina și carența în alte principii nutritive. Regimul hiposodat se impune și în cazul insuficienței cardiace și aceasta impune aportul de alimente sărace în celuloză și cu o concentrație limitată de grăsimi. Un alt exemplu, ar fi boala Addison – caracterizată de insuficiență mineralocorticosteroidă, care scade posibilitatea retenției renale a sodiului. Insuficiența glucocorticosteroidă determină o retenție hidrică importantă.

În cazul potasiului se descriu diverse situații în care este implicat, spre exemplu procesul de biotransformare a glucozei în glicogen – în care sinteza hepatică sau de glicogen necesită incorporarea a 3,6 mEq / 10 g glicogen format. Există situații în care unele produse farmaceutice sunt foarte indicate pentru anumite afecțiuni, dar datorită faptului că pacientul suferă și de alte boli nu este recomandată folosirea acelor produse. Un astfel de exemplu este cazul bolnavilor cu insuficiență renală cronică și diabetici, la care trebuie evitate unele diuretice datorită frecvenței ridicate a hipoaldosterodismului selectiv.

În general, se urmărește reducerea aportului de alimente bogate în potasiu și ridicarea aportului de produse bogate în glucide (alături de alte recomandări legate de dietă). În condițiile unei funcționări renale normale, la pacienții care prezintă glicozurie crescută (sau la cei tratați cu manitol, cu cantități mari de soluții saline izo- sau hipertone), se produce o creștere a fluxului urinar și o mărire consecutivă a kaliurezei. De asemenea, în cazul cetoacidozei diabetice, poate să apară o carență de potasiu prin antrenarea corpurilor cetonice din urină și prin intervenția diurezei osmotice secundară glicozuriei.

Sub acțiunea insulinei se realizează trecerea potasiului plasmatic în celule, fapt posibil prin pătrunderea potasiului interstițial în celule odată cu influxul de glucoză (la diabeticii aflați în cetoacidoză, insulina administrată adecvat crește pH-ul sanguin și implicit crește posibilitatea pătrunderii potasiului în celule) – Mogoș, 1997.

Din punct de vedere al nutriției, în corelarea unei diete care să asigure un aport optim și adecvat stării de sănătate trebuie să se aibă în vedere cuantumul de potasiu și concentrația în glucide a alimentului respectiv. Legumele conțin cantități apreciabile de potasiu, se vor recomanda consumarea legumelor mai puțin bogate în celuloză deoarece, în caz contrar, se vor

accentua stările de diaree și ca atare se vor înregistra și pierderi majore de potasiu. Pentru legumele bogate în amidon se va avea în vedere și natura acestuia, deoarece poate ajuta la întreținerea pierderilor de potasiu. Un astfel de exemplu este cazul amidonului din cartofi și din porumb care odată ajuns în intestinul gros fermentează și eliberează acizi și astfel se accelerează tranzitul intestinal, pierderile de potasiu fiind accelerate. Deși laptele este un aliment bogat în potasiu, pentru persoanele cu intoleranță la lactoză, acesta trebuie exclus din alimentație, deoarece în caz contrar acesta cauzează inițierea stării diuretice și ca atare accentuarea pierderilor de potasiu. În cazul unor perturbări cantitative ale potasiului și a intervențiilor clinice, atunci când este necesară o perfuzie se recomandă utilizarea serului fiziologic și nu a glucozei 5%, deoarece odată cu pătrunderea acesteia în spațiul intracelular se realizează și influxul de potasiu.

În cazul zincului în stările carentiale se recurge tot la modalități dietetice, care dacă nu dau rezultate sau dacă depleția este mare se utilizează produse farmaceutice. Dacă se recurge la administrarea parenterală de săruri de zinc, atunci se administrează diverse preparate cum sunt: gluconat de zinc, sulfat de zinc, acetat de zinc sau oxid de zinc.

Biomineralele neprezentate detaliat în acest capitol, se pare – din datele bibliografice – că nu influențează semnificativ metabolismul glucidic și ca atare nu au fost amintite (seleniu, mangan, cobalt, molibden). Dintre mineralele ce au potențial toxicogen amintim aluminiul, cadmiul, plumbul, mercurul, nichelul. Acestea nu vor fi prezentate deoarece nu se încadrează în tema acestei teze de doctorat. Totuși, doar cu titlu informativ, numeroase cercetări experimentale demonstrează efectele negative pe care le au aceste metale asupra deversurilor metabolice din organismul uman și animal (Gurjar, 1996; Kliment, 1996; Chan et al., 1997; Ostapczuk et al., 1997; Schilderman et al., 1997; Yucesoy et al., 1997; Ivanoviene et al., 2002; Attri et al., 2003).

1.3.2. Acțiunea compușilor minerali asupra metaboliților lipidici

Metaboliții de natură lipidică sunt influențați de acțiunea metalelor. Modificările, în sensul perturbării activității unor funcții din organism, sunt dependente de o serie de factori cum ar fi: natura și cantitatea metalului respectiv; prezența altor metale; starea fiziologică, mediul ambient, etc. În continuare se descriu câteva aspecte referitoare la relația metal – metabolism lipidic.

Se vor prezenta aspecte privind acțiunea diferitelor bioelemente.

Calciul – în cazul unei diete bogate în lipide saturate scade biodisponibilitatea absorbției calcice. Dacă dieta are caracter de durată se renunță la creșterea aportului grăsimilor. În bolile hepatice regimul alimentar va cuprinde alimente bogate în proteine, lipide la limita inferioară a normalului (limitarea aportului de grăsimi crește biodisponibilitatea calciului absorbabil), dar și glucide în cantitate normală.

Alături de macrobioelemente cu rol major în buna desfășurare a funcțiilor în organismul uman, se amintesc și câteva minerale care sunt prezente în organism în cantități foarte mici (de ordinul microgramelor - μg / 70 Kg / zi). Astfel cobaltul, se remarcă prin faptul că este constituent al vitaminei B₁₂. În cazul unui exces de cobalt în organismul uman se produce o creștere a valorii lipidelor totale și a colesterolemiei.

De asemenea, cuprul se poate prezenta faptul că untul poluat cu 1 μg / g cupru, râncește repede și va avea gust de pește datorită formării trimetilaminei. Brânzeturile pot suferi o transformare asemănătoare laptelui. Produsele derivate din lapte și laptele își modifică gustul datorită hidrolizei și peroxidării a grăsimilor (Mănescu et al., 1982).

Fields și Lewis (1997) au testat ipoteza care presupune că, la șobolani, deficiența de cupru poate fi o consecință hiperlipidemică doar când dieta consumată conține nutrienți care

influențează cuantumul lipidelor serice. Concluziile acestor cercetători arată că dieta bogată în grăsimi, la șobolani, nu determină creșterea cantității de lipide sanguine pentru o alimentație deficientă în cupru. În cazul unei diete bogate în grăsimi și în fructoză – care determină creșterea trigliceridelor sanguine și a fructozei, cu o deficiență de cupru – se remarcă o creștere semnificativă a colesterolului sanguin.

Experimental s-a aratat că în mecanismul de oxidare al lipoproteinelor, sub acțiunea cuprului un rol important au hidroxiperoxizii lipidici în acest proces de oxidare (Patel et al., 1999).

Cercetări efectuate asupra sucului de mere au evidențiat faptul că acesta inhibă oxidarea lipoproteinelor cu densitate scăzută (LDL) în organismul uman, reacție catalizată de cupru (Pearson et al., 1999).

Cromul – este cofactor al unor enzime implicate în metabolismul protidic, glucidic și lipidic. În cazul excesului sau carenței de crom se face un control paraclinic urmărindu-se și lipidograma. În cazul unui aport redus de crom și existența unei carențe de crom se remarcă existența unei hipercolesterolemii și hipertrigliceridemii.

Fosforul îndeplinește diverse funcții în organismul uman și anume intervine în metabolismul glucidic, lipidic și protidic, facilitând eliberarea de energie. Este constituent al glucofosfolipidelor.

În cazul iodului, se precizează faptul că în situația unui exces se constată unele aspecte cum ar fi: apariția semnelor de hipotiroidie. Din punct de vedere clinic, apare o creștere a cuantumulului de iod, scăderea iodocaptării (glanda tiroidă nu mai are capacitatea de a mai reține iod, este saturată), creșterea colesterolemiei și scăderea hemoglobinei sanguine.

În organismul uman, alături de alte minerale este prezent și kaliul (potasiul). Acesta are rol, în organismul uman, de activator al unor enzime ce participă la metabolismul lipidic. În cazul carenței de potasiu apar diferite manifestări clinice dintre care amintim lipotimie, transpirații reci, paloare, hipotensiune ortostatică etc. Tratamentul dietetic constă în întocmirea unei rații alimentare echilibrate. În cazul unei depleții de potasiu, se va limita aportul de substanțe grase (bogate în lipide) deoarece prin efectul colecistokinetic și peristaltogen al sărurilor biliare care participă la digestia lipidelor, crește tranzitul intestinal și implicit pierderile de potasiu.

În cazul unor studii experimentale s-au determinat anumiți parametri fiziologici. Astfel, Kawasaki et al., 1998 a încercat reducerea hipertensiunii arteriale prin reducerea aportului de sodiu și creșterea aportului de potasiu și magneziu. Rezultatele experimentului au arătat că natriemia și cloremia au scăzut semnificativ, în timp ce potasiul seric și HDL-colesterolul au crescut după 5 săptămâni de experimentare. Autorii au concluzionat faptul că în Japonia, în prezent, există un exces de sodiu și un aport insuficient de potasiu și magneziu în dietă, iar acest aspect ar putea fi înlăturat prin folosirea unor condimente de aseasonare – preparate cu anumite săruri minerale.

De asemenea, magneziul este un metal cu diverse roluri biologice deosebit de importante pentru organismul uman. Dintre acestea amintim: activarea unor enzime implicate în metabolismul protidic, lipidic și glucidic; stimularea activității unor hormoni; potențarea metabolismul energetic al cordului; împiedicarea acumulării de calciu și sodiu pe pereții vasculari și scaderea colesterolemiei – ceea ce previne sau împiedică procesul de agravare a aterosclerozei. Deficitul de magneziu determină perturbarea sistemului vascular prin creșterea depunerilor de calciu, sodiu și colesterol în peretele arterial și prin spasmul musculaturii netede din tunica medie. Pentru a “trata” carența de magneziu se recomandă și folosirea unor diete deficitare în lipide, care nu permit consumarea limitată a produselor cerealiere lipidogene chiar dacă prezintă conținut ridicat în magneziu.

Manganul intervine în transferul de energie. Carența de mangan determină scăderea fosfolipidelor serice, trigliceridelor și a manganului seric. Manganul este prezent în toate

țesuturile organismului, având concentrații mai ridicate de obicei în ficat, rinichi, pancreas (Tipton și Cook, 1963).

Un alt mineral important din punct de vedere fiziologic este molibdenul, care intervine în metabolismul lipidelor și a acizilor nucleici. Menținerea unui aport echilibrat duce la buna desfășurare a proceselor metabolice și la o stare de sănătate adecvată, dacă sunt asigurate și celelalte aspecte.

În cazul sodiului se precizează, cu titlu informativ, că pentru situațiile în care se impune o restricție strictă de sodiu pot interveni probleme acute în ceea ce privește calitatea rației alimentare. Problema legată de principiile nutritive se referă în primul rând la aportul de principii nutritive de către produse de origine animală și vegetală care de obicei sunt bogate în sodiu dar și în alte principii nutritive. În cazul hipertensiunii arteriale – se știe că se recomandă un aport redus de sodiu.

Se mai poate aminti faptul că, în general, bioelementele metalice participă la diverse reacții ce au loc în organism. Dintre acestea amintim posibilitatea de a reacționa cu acizii – deci formarea de săruri cu acizii grași; formarea de metaloproteine prin reacții de coordonare a unor substanțe minerale metalice.

1.3.3. Acțiunea compușilor minerali asupra metaboliților protidici

Alături de metaboliții glucidici și lipidici – metaboliții protidici participă la caracterizarea fiziologică a organismelor uman și animal. Pentru a prezenta acțiunea metalelor asupra metaboliților protidici se prezintă pe scurt câteva date generale din literatura de specialitate.

Calciul – în cazul prezenței în exces se impune efectuarea unor analize clinice de laborator care să urmărească: eventualele modificări radiologice, modificări electroradiografice, instalarea hipercalcemiei, hipofosfatemiei, creșterea fosfatazei alcaline, creșterea concentrației de magneziu și de hidroxiprolină în urină. Dietoterapia în aceste situații se corelează cu afecțiunile prezente. Înlocuirea laptelui (datorită intoleranței la lactoză) în alimentație, folosit ca sursă proteică se poate realiza printr-un aport adecvat de carne și derivate. Se menționează faptul că peștele este o sursă mai bogată în calciu decât carnea se reduce consumul în hipercalcemie. Celelalte surse de proteine de origine animală au caracter acidifiant, favorizând instalarea litogenezei calcice – datorită creșterii pH-ului urinar. În bolile hepatice regimul alimentar va cuprinde produse care conțin proteine cu valoare biologică mare (e.g.: lisina și arginina au rol hepatotrof și determină creșterea absorbției calciului intestinal).

Cobaltul participă la buna funcționare a eritrocitelor și crește sinteza gamaglobulinelor, iar cromul are rol de cofactor al unor enzime, având influență și asupra metabolismului proteic.

Cuprul este prezent în majoritatea țesuturilor din organismul uman. În sânge sunt prezente complexe cuproproteice și anume ceruloplasmina – care asigură transferul cuprului de la țesuturile extrahepatice către ficat și excreția biliară, și eritrocupreina – provenită din măduva osoasă în timpul formării normoblaștilor. Carența de cupru determină o diminuare a procesului de încorporare a cuprului de către ceruloplasmină și astfel, eliminarea oligoelementului din țesuturi este limitată. Acest proces se presupune că este cauza instalării bolii Wilson. Sursele de proteine animale bogate în histidină și leucină cresc absorbția cuprului chiar dacă acesta se află în concentrații reduse în organism. De asemenea, prin efectul hemolitic, methemoglobinizant și tiolopriv (inactivant al tirozinelor) acesta poate cauza moartea. De asemenea, intoxicația cronică cu peste

500 µg / g cupru determină o îmbogățire de 20 de ori mai mare a ficatului cu metal, deprimarea creșterii, hemocromatoză consecutivă hemolizei, necroză hepatică etc.

Fierul este un element metalic esențial, prezent în majoritatea celulelor. Nu se poate aminti de rolul fierului în organism, fără a prezenta hemoglobina – fierul fiind prezent în procent de 0,34 % în molecula acestuia. În hemoglobină (cromoproteină) se găsește aproximativ 3 g fier, ceea ce reprezintă aproximativ 65 % din cantitatea totală de fier din organism. Forma de depozit a fierului (25-30 %) este feritina și homosiderina, iar în mioglobină se găsesc aproximativ 350 mg de fier. Aproape toată cantitatea de fier este legată de transferină și este preluată de măduva osoasă, unde eritrocitele folosesc transferina în scopul completării conținutului lor în hemoglobină. În mod cert, în cazul unor carențe sau excese de fier, se recurge la examene de laborator care urmăresc concentrația medie a hemoglobinei sanguine și volumul eritrocitelor. În cazul unor excese de fier (hemosideroze) se recurge la o dietoterapie, care presupune reducerea severă a proteinelor de origine animală și implicit aportul fierului, iar în cazul unor anemii (carențe ferice) se recomandă consumul de alimente bogate în proteine animale.

Fosforul, în organismul uman dar și animal, îndeplinește numeroase funcții și anume intervine în metabolismul glucidic, lipidic și protidic, favorizând eliberarea de energie (o legătură energetică din cadrul adenozinfosfat eliberează 8000 Kcal); intervine în absorbția și transportul substanțelor nutritive etc. În cazul excesului de fosfor și a insuficienței renale cronice se impune restricția proteică pentru a diminua ureogeneza și aportul de fosfor (deoarece alimentele bogate în proteine conțin cantități însemnate de fosfor).

În cazul excesului de iod examenul clinic de laborator indică, pe lângă creșterea concentrației de iod, și scăderea iodocaptării, dar și a hemoglobinei și leucocitelor sanguine. De asemenea, sub acțiunea tiocianatilor și polifenolilor este influențată capacitatea de fixare a iodului la gruparea hidroxilică, și astfel apare o competiție cu tirozina – care determină diminuarea sintezei hormonilor tiroidieni. Iodul prezintă importanță deosebită intrând în compoziția acestora: triiodotironina și tetraiodotironina, care la rândul lor stimulează transformarea carotenilor în vitamina A.

Potasiul în organism intervine și în sinteza unor hormoni cum sunt: insulina, glucagonul, hormonul de creștere și catecolaminele. Hipoaldosteronismul selectiv sau cel caracteristic bolii Addison duce la reducerea schimbului electrolitic dintre sodiu și potasiu la nivel renal. Depleția sodică intervine în instalarea deficitului de potasiu prin activarea pompei sodiu/potasiu.

Magneziul este implicat în acțiunea enzimelor asupra metabolismului protidic. Carența de magneziu favorizează apariția reacțiilor alergice prin accentuarea fragilității membranei mastocitare cu eliberarea unor cantități însemnate de histamină. Asemeni depleției de calciu, și în cazul magneziului se recomandă un aport exogen alimentar de produse bogate în proteine cu valoare biologică mare – care cresc absorbția și utilizarea optimă a magneziului.

Manganul intervine în formarea adenozin-monofosfatului ciclic (AMPC), important în metabolismul protidic.

În cazul carenței de sodiu, pentru examenul clinic de laborator se evidențiază prezența hiponatriemiei, reducerea osmolarității plasmatică, creșterea azotemiei, creșterea hematocritului și hemoglobinei etc. Dacă se impune o restricție de sodiu pot apare și probleme privind selecția principiilor nutritive, legate în special de aportul de proteine animale, a legumelor proaspete și a diverselor băuturi. Ouăle furnizează cca 8mg de sodiu per gram de proteină – considerabil mai mult decât aportul sodic al cărnii. De asemenea, brânza de vaci proaspătă conține aproximativ aceeași cantitate de sodiu per gram de proteină. Dacă se dorește creșterea aportului de proteină și reducerea concomitentă a

aportului sodic, se recomandă eliminarea ouălor, înlocuirea laptelui integral și a brânzei de vaci cu lapte desodat (preparată prin precipitarea proteinelor cu ajutorul oțetului). Totodată, se recomandă limitarea consumului de carne la cel mult 200 g per zi. În cazul unui exces de sodiu apare și o hiperfuncționare a glandei suprarenale și creșterea secreției de aldosteron.

Potasiul este corelat cu sodiul. Astfel în explorările clinice de laborator în carența sodică se recomandă determinarea ionogramei sanguine și urinare, a proteinemiei, creatininei, ureei sanguine etc. Potasiul este implicat și în procese de biosinteză a proteinelor – pentru fiecare gram de azot ce intră în structura proteinelor celulare se rețin aproape 3 mEq de potasiu.

Cu privire la seleniu în cazul carenței acestuia scade activitatea glutatationperoxidazei din eritrocite, iar în exces scade activitatea dehidrogenazei succinice, ureazei, colinoxidazei și a prolinoxidazei. De asemenea, carența de seleniu determină scăderea concentrației enzimelor serice, în general (Kulinski, 1991).

Prezența unor compuși ai sulfului, rezultați prin formarea de hidrogen sulfurat (H_2S), pe seama tioaminoacizilor, determină înnegrirea alimentului – proces ce are loc consecutiv cu formarea sulfurii de cupru. Printr-un proces complex, la care participă proteinele, taninurile, tiolul, compușii simpli, lumina și scăderea pH-ului se poate forma cisteină din cistină, fapt care determină creșterea vitezei de absorbție a cuprului de către proteina detanturată și în acest fel apar modificări organoleptice caracterizate prin tulburări sau precipitări mai semnificative (Mănescu et al., 1982).

Zincul este prezent în organismul uman în cantitate destul de mare (1,8g) și se găsește în organe, mușchi, piele și hematii. Este activator al unor enzime cu rol în metabolism. În carența de zinc prin dietoterapie se observă și o ameliorare a insulinosecretiei și a anabolismului proteic.

De asemenea, colectivul condus de Zorbas a studiat relația dintre apă și excreția de electroliți la șobolani în timpul absenței prelungite a activității motorii și o hiperhidratare cronică. Concluzia cercetătorilor a constat în faptul că un aport zilnic de lichide și o suplimentare minerală este benefică pentru a crește nivelul hidratării în organism și pentru a scădea excreția electroliților prin lichidele biologice și pentru pierderea în greutate în cazul unei restricții prelungite de activitate motorie (Zorbas et al., 1998).

1.3.4. Acțiunea compușilor minerali asupra metabolismului hidro- electrolitic

Echilibrul hidro-electrolitic este influențat de diverși factori dintre care amintim acțiunea unor biometale sau metale cu potențial toxicogen. Datorită faptului că există așa numitele interrelații între ionii metalici, acțiunea metalelor asupra electroliților prezenți în organism determină desșori perturbarea stării fiziologice generale. În anumite cazuri, s-a demonstrat că un exces de anumiți electroliți, printr-un aport de compuși metalici poate redresa cuantumul electroliților în exces. De asemenea, studii experimentale au demonstrat că suplimentarea dietei cu minerale poate rezolva problema unei carențe (depleții) de anumiți electroliți. În acest sens se prezintă unele date bibliografice din literatura de specialitate.

Calciul intervine în utilizarea fierului din alimentație și în procesul de absorbție a vitaminei B_{12} . Hipervitaminoza D este una din cauzele instalării unui exces de calciu în organism. Excesul de calciu determină creșterea concentrației de magneziu și în osteoza fibrochistică apar demineralizări difuze în zone osteolitice, dar și hipercalcemie și hiperfosfatemie. Dieta recomandată trebuie să fie bogată în fosfor și celuloză – deoarece

aceasta captează o parte din calciul intestinal și astfel devine inapt pentru absorbție. În cazul unei carențe de calciu se recomandă un regim alimentar în care aportul de calciu / fosfor este optim pentru absorbția calciului. De asemenea, se recomandă consumarea alimentelor bogate în vitamina A, vitamina C, vitamina F, în fier, mangan și magneziu.

Studiul condus de Petrov a urmărit variațiile biologice ale electroliților reprezentați de microelemente esențiale în sânge la fete și mamele acestora. Rezultatele experimentale au prezentat variații biologice ale concentrației serice a calciului total, a magneziului, a fierului, a zincului și a cuprului. Concluziile au constat în faptul că homeostazia calciului, magneziului, fierului și zincului la fete este dependentă și de factori materni (Perkov et al., 1998).

În cazul expunerii unor muncitori la diverse produse chimice (de 2 – 3 ori pe săptămână sau timp de 3 – 5 ani) se constată un nivel scăzut al ATP-ului, al potasiului, al magneziului, calciului, precum și o scădere a ATP-azei dependentă de magneziu și calciu și un nivel crescut al ADP, AMP, sodiu, fosfor, dar și o activitate crescută a APT-azei dependente de potasiu și sodiu și a glucozo-6-fosfatdehidrogenazei (Shakirov et al., 1998).

McNulty și Taylor (1999) au studiat efectul ionilor metalici cu potențial toxicogen asupra ionului de calciu în hepatocite. Astfel s-a constatat că nichelul ionic produce o creștere a calciului ionic, ca rezultat al mobilizării calciului ionic depozitat intracelular. Efectul ionilor de nichel a fost atenuat prin creșterea magneziului ionic printr-un aport de clorură de mangan, de cobalt, de cadmiu sau prin scăderea pH-ului extracelular de la 7,3 la 6,0. De asemenea, clorura de cupru, de zinc și de lantan, a scăzut acțiunea ionului de nichel și a crescut mobilitatea ionilor de calciu. Concluziile experimentului au arătat că ionii de nichel, zinc, cupru și lantan determină o creștere a calciului ionic în celulele hepatice prin stimularea activității hormonale – sensibilă la concentrația calciului ionic. Acest aspect poate explica faptul că ionul de calciu pare a fi important în activitatea celulelor hepatice, în procesul de reglare a concentrației plasmatice a ionilor metalelor cu potențial toxicogen și poate media răspunsul ionilor de zinc – eliberați în circulația portală alături de insulină.

La animale de experiență s-a demonstrat că administrarea zilnică intravenoasă a calciului poate preveni insuficiența renală acută. Concluzia experimentului arată că o suplimentare cu calciu ajută la diminuarea riscului de insuficiență renală acută asociată cu antibiotice aminoglicozidice (Brashier, 1998).

Un aport scăzut de clor ionic influențează activitatea de cotransport a ionilor de potasiu (Guizouarn și Motais, 1999).

În cazul excesului de cupru, pentru a scădea concentrația de cupru în organism se impune o dietă bogată în celuloză, fitați, vitamina C, dar și elemente minerale cum sunt: zinc, fier, fosfor, calciu, sulfati, mangan, molibden – deoarece acestea intră în competiție cu cuprul alimentar sau produc chelatarea acestuia și astfel împiedică absorbția cuprului.

Patel și Darley-Usmar (1999) descriu mecanismul prin care cuprul inițiază oxidarea lipidelor cu densitate scăzută (LDL) și importanța hidroperoxizilor lipidici în acest proces. Mecanismul reacției se descrie ca fiind oxidare in vivo a LDL, dependentă de metale și de alți factori cu rol antioxidant.

Reducerea sau carența ionilor de cupru produce apariția unui pic în banda de absorbție spectrală la lungimea de undă 600-590 nm datorită detașării imidazolului de cupru, dacă cuprul este în stare oxidată (Venerini et al., 1999).

Radicalii liberi influențează activitatea diferiților mutanți, facilitând eliberarea ionilor de cupru din anumite macromolecule. Ionii de cupru astfel eliberați pot influența producerea radicalilor hidroxilici și astfel are un rol important în procesul de denaturare oxidativă a macromoleculilor (Eum și Kang, 1999).

Datorită unui efect electrochimic, prezența cuprului, mai ales în conservele vegetale, determină accelerarea coroziunii și mărește contaminarea acestora cu fier și staniu provenit din ambalaj (Mănescu et al., 1982).

Pentru excesul în magneziu se recomandă un aport alimentar bogat în fosfor, calciu (deoarece calciul în exces inhibă absorbția magneziului), creșterea aportului proteic și de zinc. Deficiența magneziului determină creșterea depunerilor de calciu și sodiu pe peretele arterial și ca atare se recomandă o dietă bogată în vitamina B₆ și vitamina E, dar și magneziu.

Accentuarea carenței de magneziu (hipomagneziemie) și potasiu (hipokaliemie) pot fi datorate și consumului de alcool (Denison, 1994).

Suplimentarea rației alimentare cu magneziu, în cazul în care există o carență este eficientă dacă se asociază și cu restricție a activității musculare (Zorbas et al., 1998).

Corecția depleției de magneziu egalează eliminările de potasiu, ceea ce înseamnă că deficiența de magneziu este asociată cu kaliureza. De asemenea, depleția de magneziu influențează concentrația calciului plasmatic.

Studiile inițiate de Rondanelli au studiat funcțiile cognitive și activitatea electrolică la vârstnici, precum și relația dintre sodiul sanguin și concentrația clorului (Rondanelli et al., 1998). Atele experimente au demonstrat o corelare în „Mini-Mental State Examination” (metoda de investigare a statusului cognitiv și nutrițional folosită de autori) și concentrația sodiului și clorului sanguin, precum și absența unei relații între celelalte date nutriționale.

Un alt studiu întreprins de colectivul condus de Sosa pe cai a arătat că administrarea de „concentrate cu bioelectroliți” influențează cuantumul electroliților sanguini. Produsele administrate au constatat în suplimentarea cu ioni de sodiu, potasiu și clor. Cercetătorii au concluzionat faptul că administrarea de suplimente de electroliți (sub formă de pastă) prezintă avantaje prin realizarea unui echilibru hidroelectrolitic și a echilibrului acido-bazic (Sosa et al., 1998).

Sodiul intervine în echilibrul hidroelectrolitic și îndeosebi în repartiția apei în spațiul intra- și extracelular. Excesul de sodiu se asociază cu creșterea volumului de lichid extracelular; dar există și cazuri în care se creează o retenție mai mare de apă datorită eliminării în cantități mari de sodiu. De asemenea, pot apare hemoragii intracraniene după creșterea rapidă a osmolarității, sau instalarea semnelor de hiperhidratare celulară. Deseori o restricție a sodiului prin aport alimentar este suficientă pentru îndepărtarea sodiului în exces din organism. Boala Addison – insuficiență mineralocorticoidă – scade posibilitatea retenției renale a sodiului, iar insuficiența glucocorticoidă determină o retenție hidrică importantă.

Fosforul alături de calciu și magneziu îndeplinește în organism diverse roluri dintre care amintim: asigură structura dinților și a oaselor, intervine în echilibrul acido-bazic al organismului, etc. Hipoparatiroidismul duce la scăderea clearance-ului fosforului și implicit la hipofosfaturie și hiperfosfatemie secunară. De asemenea, excesul de fosfor determină depunerea sărurilor de fosfat de calciu în țesuturile moi. Dietoterapia impune limitarea aportului de fosfor, administrarea de produși cu rol de chelatare la nivel intestinal (compuși cu aluminiu, fier) și reducerea aportului de vitamina C, deoarece aceasta crește absorbția intestinală a fosforului. În cazul unei carențe de fosfor dieta trebuie să asigure cantități suficiente de vitamine A, vitamine D, vitamine F și de minerale: calciu, iod și mangan, deoarece acestea ajută la compensarea mai rapidă a carenței de fier. În cazul fierului, creșterea consumului de fosfor determină scăderea absorbției fierului datorită formării unor complexe insolubile de fosfat feric.

Sărurile de staniu divalent sunt mai toxice decât cele de staniu tetravalent, datorită abilității de a lega grupările tiolice.

Rezultatele experimentale ale colectivului lui Wang demonstrează că ionii de zinc și cupru pot schimba selectiv factorul de creștere mediat nervos (“nerve growth factor”) rezistent la un stress oxidativ și prezintă importanță pentru funcțiile neuronilor atât în condiții fiziologice normale, cât și în condiții patologice (Wang et al., 1999).

Studii diverse au demonstrat că la animale vârsta are o influență asupra concentrației multor nutrienți sanguini, de asemenea starea fiziologică generală și în special în cazul fetușilor (Smith et al., 1998).

Intoxicația cronică indusă de excesul de zinc prezintă manifestări clinice corelate cu deficiența de fier și cupru.

Datele expuse mai sus relevă diverse aspecte privitoare la acțiunea compușilor minerali asupra metabolismului hidro-electrolitic și implicațiile biochimice și fiziologice.

1.4. Bioelemente metalice și metale cu potențial toxicogen

Prezența compușilor biominerali în organismul uman este esențială pentru o stare de sănătate optimă. Cuantumul acestora în organismul uman variază de la cantități de ordinul gramelor la concentrații de ordinul microgramelor (considerate de unii autori „urme”). Considerații de ordin structural privind compușii minerali facilitează cunoașterea a aspectelor nutriționale și biomedicale, vizând posibile mecanisme ale interacțiilor biochimice cu repercursiuni de natură patobiochimică și farmacologică.

Substanțele minerale – în literatura de specialitate – se clasifică diferit. Toate clasificările au în vedere rolul acestor substanțe minerale pentru organismul uman și implicațiile survenite în cazul carenței sau excesului. În acest sens în continuare se prezintă mai multe clasificări din literatura de specialitate (Underwood, 1977; Ghergariu, 1980; Weisell, 1992; Anke et al., 1993a; Gârban 1999; Ghizdavu, 2000).

O primă clasificare are în vedere rolul biologic și de concentrația bioelementelor minerale (sau elementelor biogene) în sistemele vii.

- a) Macrobioelemente numite și elemente macrobiogene – din care fac parte bioelementele cuaternare: carbonul, oxigenul, hidrogenul și azotul, dar și un bioelement cu caracter cationic – calciul și unul cu caracter anionic - fosforul;
- b) Oligobioelemente sau elemente oligobiogene – care cuprind bioelementele prezente în cantități mai reduse în organismul uman (0,05-0,75%) reprezentate de substanțe cu caracter cationic (metalic): potasiul, sodiul, magneziul; și dintre elementele cu caracter anionic (nemetalic): sulfurul și clorul;
- c) Microbioelemente cunoscute și sub denumirea de elemente microbiogene – în cantități mai reduse în organismul uman Acestea la rândul lor se clasifică în două subgrupe, și anume:
 - microbioelemente invariabile sau indisociabile: fier, cupru, zinc, cobalt, molibden – dintre cele cu caracter cationic și fluorul și iodul – dintre elementele anionice;
 - microbioelemente variabile (care nu sunt indispensabile pentru organismul uman), reprezentate de: nichel – ca și metal și seleniu, siliciu și bor – nemetale.

O altă clasificare are în vedere aspectele legate de chimia bioanorganică și cuprinde patru clase de compuși minerali astfel:

- a) Elemente esențiale majore: elementele esențiale majore – care ocupă cca. 99,9% din compoziția sistemelor vii și sunt împărțite la rândul lor în două grupe:
 - de tip nemetalic care stau la baza edificiului molecular al materiei vii (7 elemente): H, C, O, N, P, S, Cl;
 - metale alcaline și alcalino-pământoase: Na, K, Ca, Mg.

- b) Elemente esențiale în urme (denumite și microelemente, oligoelemente, oligominerale), care ocupă 0,1% din compoziția sistemelor vii. Acestea sunt esențiale pentru desfășurarea funcțiilor vitale, dar sunt prezente în concentrații foarte mici în sistemele biologice (de ordinul ppm sau ppb). Aceste elemente sunt clasificate în două grupe:
- tranziționale: Fe, Cu, Mn, Zn, Co, Mo, Cr, V, Ni;
 - netranziționale: Se, I, F, B, Si.
- c) Elemente posibil esențiale în urme: din care fac parte Br, As, Sn, W.
- d) Elemente neesențiale și tolerabile numai între anumite limite: Sb, Hg, Pb, Au, Ag, Bi.

Comitetul de experți FAO/WHO/IAEA au avut o întâlnire la Geneva în 1990 pe probleme legate tocmai de clasificarea oligoelementelor, iar Raportul acelei întâlniri a fost scris de Weisell și publicat de către W.H.O. doi ani mai târziu, în anul 1992 (Weisell, 1992).

Clasificarea acreditată de către FAO/WHO/IAEA prevede împărțirea substanțelor minerale în doar două grupe, astfel:

- a) Macrominerale – necesare în organism în concentrații relativ mari: sodiu, potasiu, clor, calciu, fosfor, magneziu;
- b) Microminerale (tracce minerals) – necesare organismului în doze mici: seleniu, fier, zinc, cupru, mangan, molibden, crom, arsen, germaniu, litiu, rubidiu, staniu.

În Raportul publicat de către WHO s-a definit ca esențial, elementul din organism pentru care reducerea aportului sub o anumită limită determină modificarea în sens negativ a unei funcții importante a organismului sau elementul care este parte integrantă a unei structuri organice cu o funcție vitală în organism. Dovedirea esențialității unui element la o specie de animale nu presupune esențialitatea la o alta specie.

Interesantă este precizarea că definițiile și conceptele nu sunt identice între organizații. Extensia de la neesențial sau posibil esențial la esențial s-a făcut pe parcursul anilor în urma multor experimente de laborator efectuate pe animale de experiență.

Trebuie amintit faptul că există anumite substanțe considerate ca lipsite de rol benefic pentru organismul uman, Acestea sunt recunoscute ca substanțe sau elemente cu potențial toxicogen și sunt considerate a fi poluanți de natură anorganică. Efectele produse de prezența elementelor cu potențial toxicogen pentru organismul uman sunt multiple și au implicații toxicologice. Efectele sunt condiționate de o serie de factori cum ar fi: concentrația în organism; prezența altor substanțe minerale; biodisponibilitatea acestora; perioada de expunere; intensitatea expunerii la toxicul respectiv, etc.

1.4.1. Rolul și mecanismele de acțiune ale unor bioelemente metalice

În continuare se vor prezenta date succinte despre bioelementele metalice urmărind rolul biochimic și mecanismele de acțiune fiziologice.

1.4.1.1. Macroelemente metalice prezente în organismul uman

Calciul. Se află în cantitate medie de 950 g (3,45 %) în organismul unui adult, fiind repartizat în țesuturi, umori și secreții glandulare. Cea mai mare cantitate se găsește repartizată în oase sub formă insolubilă. Fixarea calciului în oase sub formă de apatite hidroxilice și carbonice este un proces biologic activ, care are loc sub acțiunea unor enzime. Sărurile complexe au ca atom central coordinativ ionul de calciu. Cantități însemnate se află sub formă de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Pe acest compus se pot fixa și desorbi anioni de tip hidroxil, carbonat, fosfat acid, carboxil, substanța minerală a oaselor având rolul unui schimbător de ioni.

În umorile organismului, calciul este prezent în proporții de cca. 10 mg % sau 5 mEq / L în sânge, lichid interstitial și doar în cantități reduse în spațiul intracelular. La acest nivel calciul se găsește sub trei forme importante: calciu ionic; calciu solubil (e.g.: citratul de calciu) și calciu insolubil.

Calciul se fixează de proteine la grupările carboxilice în funcție de pH-ul sângelui. Când pH-ul tinde spre valoarea alcalină (7,35 spre 7,40) proteinele devin mai electronegative, sarcinile negative cresc și ionul divalent de calciu se fixează de proteine sub formă de calciu proteic insolubil și neionizabil.

În stările de acidoză, care se realizează în organism când procesele catabolice se intensifică, proteinele devin mai alcaline, ionul de calciu este eliberat, iar concentrația lui crește în sângele circulant. În stările de alcaloză (când mediul are pH alcalin) concentrația calciului în sânge scade. Ionul de calciu moderează excitabilitatea neuromusculară prin intermediul membranelor celulare. Astfel, creșterea cantității ionilor de calciu duce la scăderea excitabilității, pe când în stările de alcaloză are loc creșterea excitabilității neuromusculare.

Ionul de calciu din spațiul extracelular contribuie nu numai la reglarea excitabilității, dar și la cuplarea cu procesele specifice contracțiilor și activității secretoare celulare, accelerând desfășurarea manifestărilor vitale în direcția impusă acestora de structurile proteice. Calciul intervine în activarea sau inhibarea diferitelor enzime. În lapte intervine în formarea cazeinatului de calciu.

Similar cu hidroxiapatita de la nivelul scheletului, există hidroxiapatită în emailul și dentina dinților, care însă contribuie prea puțin la biodisponibilitatea calciului și homeostazia calcemiei la nivel sanguin.

Pe lângă faptul că acest metal este un constituent structural major pentru organismul uman, calciul intervine în procesul de eliberare a energiei din ATP necesară pentru contracția musculară. De asemenea, calciul este important în procesul de coagulare a sângelui. Astfel, calciul ionizat stimulează eliberarea de tromboplastinei, convertește protrombina în trombină care ajută la conversia fibrinogenului în fibrină (implicată direct în coagularea sângelui). Calciul mediază funcțiile de transport ale celulelor și sinteza, secreția, dar și efectele metabolice ale hormonilor și ale unor enzime. Intervine în procesul de reglare a ritmului cardiac, ajută la menținerea tonusului muscular și are rol în receptivitatea mușchiului la stimulii nervoși.

Necesarul de calciu pentru organismul uman este de aproximativ 800 mg / zi, dar crește cu 500 mg / zi în cazul femeilor însărcinate sau lăuze.

În cazul în care apare un exces de calciu în organism acesta poate duce la hipercalcemie. De asemenea, excesul de calciu sanguin este însoțit de o deprivare a calciului în oase – situație în care se ajunge la calcifierea cartilagiilor, exostoze etc.

Absorbția calciului se face predilect în duoden. Bolul alimentar ajuns în stomac, sub acțiunea secreției gastrice, formează chimul gastric, care devine alcalin la nivelul intestinului subțire absorbția calciului încetează. Calciul poate fi absorbit și la nivelul intestinului subțire prin transport celular activ și prin difuzie simplă. De asemenea, absorbția calciului metalic poate fi limitată la sub 10 % și este influențată de prezența altor substanțe din intestin. Un alt factor hotărâtor în absorbția calciului este forma chimică în care se găsește acesta (ion metalic sau în diverse combinații) – Ishitani et al., 1999. În organismul uman, calciul este absorbit sub formă solubilă în apă și sub formă de compuși organici proveniți din sisteme coloidale.

Carența de calciu poate fi datorată unui aport insuficient de vitamină D, prezenței unei hipoclorhidrii (secreție gastrică redusă). Vârsta, unele probleme ereditare, modul de viață și obiceiurile alimentare sunt factori care cresc riscul unei carențe de calciu. De asemenea există factori care depind de organism și care ar putea duce la hipocalcemie sunt: stressul cronic emoțional, sedentarismul, intoleranța la lactoză etc.

Obiceiurile alimentare și dieta sunt factori esențiali care pot duce la deficiențe de calciu. Astfel, în mod concret am putea aminti: consumarea de alimente bogate în lipide, aport insuficient de proteine dar consum ridicat de fitați, oxalați sau alte substanțe antiminerizante, precum și excesul de cafeină din cafea, ceai, sau diverse băuturi (Coca Cola, Pepsi Cola etc.), excesul de sodiu, fosfor sau fibre alimentare, dar și fumatul.

De asemenea, consumul unor produse medicamentoase, cum ar fi utilizarea pe termen lung a corticosteroizilor pot determina scăderea cantității din organism. Starea de sănătate este un factor esențial în apariția hipocalcemiei și din acest motiv unele afecțiuni pot favoriza procesul de spoliere a organismului de calciu. Afecțiunile renale, diabetul, utilizarea unor uleiuri minerale (ca și laxative), ingestia de carbonat de litiu (forma de litiu solubil în apă), folosirea unor diuretice pe termen lung pot facilita producerea hipoglicemiei.

Parathormonul secretat de glanda paratiroidă și calcitonina secretată de glanda tiroidă mențin homeostazia calciului seric. Parathormonul poate interveni și la nivelul rinichiului prin reținerea unei cantități mai mari de claciu decât este necesar și în final se pot forma calculi renali. Când valoarea calciului sanguin începe să crească datorită unei activități crescute a paratiroidei, intervine calcitonina și reduce biodisponibilitatea calciului de la nivelul scheletului.

Calciul scade tensiunea la pacienții cu hipertensiune spontană (care nu este cauzată de boli renale) datorită faptului că relaxează vasele sanguine și poate, de asemenea, să diminueze sindromul premenstrual.

Simptomele unei deficiențe prelungite de calciu includ insomnie, palpitații ale cordului și spasme musculare. Un aport scăzut de calciu pentru o lungă perioadă de timp (carență cronică de calciu) poate duce la fracturi ale oaselor (și datorită densității osoase scăzute – cazul osteoporozei) și hipertensiune. De asemenea, în cazurile de carență severă de calciu simptomele pot fi diverse: convulsii, demență, osteomalacie, rahitism, precum și boli ale dinților.

Eliminarea calciului se face în proporție de peste 75 % prin fecale, iar prin urină și transpirație cca. 2 %. În cazul unei activități musculare mai intense, cantitatea de calciu eliminată prin transpirație se poate dubla sau chiar tripla (cazul unor atleți când se poate elimina prin transpirație până la 15 mg Ca per zi). De asemenea, excreția în exces a calciului prin urină (cazul osteoporozei, excesului de fosfor etc.) poate duce la formarea calculilor renali sau a unor depozite osoase de calciu (“bone-like”) de tip „exostoză”.

Magneziul. Intră în compoziția organismului adult într-o cantitate de 35 g (0,10 %). Se găsește în oase în cantități mari și anume 2/3 din cantitatea totală, precum și în lichidele extracelulare 4 % sau 1,5 mEq / L. În lichidele intracelulare magneziul are valori cuprinse între 13,33 % și 80 %, fiind un ion caracteristic intracelular. Dintre țesuturile care conțin cantități importante de magneziu amintim ficatul și mușchii, fiind al doilea ca distribuție în celule după potasiu.

Necesarul de magneziu este estimat la 350mg Mg per zi pentru bărbați și 280-300 mg Mg per zi pentru femei, iar pentru femei însărcinate sau care alăptează necesarul este de 450 mg Mg per zi. O dietă care este hipocalorică conduce implicit la carență de magneziu. Factorii care determină depresia magneziului în țesuturi și lichide biologice sunt: consumul unor cantități ridicate de fibre alimentare, ingestia unor alimente bogate în fosfați (e.g.: băuturile răcoritoare), consumul exagerat de alcool, stressul, unele medicamente diuretice ș.a.

Magneziul este implicat în majoritatea proceselor metabolice de bază alături de ATP, care este furnizorul principal de energie pentru celulele din organism. Participă la procesele de biosinteză a proteinelor, precum și a acizilor nucleici DNA și RNA și este cofactor al unor sisteme enzimatice. Magneziul este necesar pentru contracția mușchilor și neuroexcitabilitatea. Alături de ATP formează complexul ATP-Mg și activează peste două sute de enzime. De asemenea, magneziul intervine ca protector în unele boli cardiovasculare,

menține un status morfofuncțional normal al cordului și previne aritmiile cardiace. Ajută la reducerea tensiunii arteriale, scade colesterolul și lipoproteinele cu densitate scăzută (LDL) și crește lipoproteinele cu densitate ridicată (HDL). De asemenea un aport optim de magneziu reduce toxicitatea plumbului și previne formarea calculilor renali (McCarty și Kumar, 1999).

Consumul unor suplimente alimentare foarte bogate în calciu poate conduce la o competiție între calciu și magneziu. Carența de magneziu poate apare datorită malabsorbției, malnutriției, alcoolismului și datorită unei nutriții exclusiv parenterale care nu conține suficient magneziu. Deficiența de magneziu este des întâlnită în special la adolescenți, diabetici, la persoanele care țin regim alimentar, la femeile însărcinate și care alăptează, bătrâni cu obiceiuri alimentare necorespunzătoare din punct de vedere nutrițional, persoane suferinde de osteoporoză, precum și persoanele care au probleme renale sau suferă de diaree severă.

Excesul de magneziu conduce la inhibarea calcificării osoase. Calciul și magneziul au roluri antagonice în ceea ce privește contracția normală a mușchiului, calciul având rol de stimulare a contracției, iar magneziul de relaxare musculară. De asemenea, calciu în exces poate induce deficiența de magneziu. Pe de altă parte, excesul de magneziu conduce la carențe de alte minerale și chiar la intoxicație cu magneziu. În general intoxicațiile cu magneziu apar în cazul unor afecțiuni renale.

Absorbția magneziului se face în intestinul subțire. Raportul absorbției magneziului variază între 24 și 85 %. Absorbție mai mare este întâlnită în cazul cu magneziului din sisteme coloidale. Cuantumul de vitamină D nu are nici un efect asupra absorbției magneziului. Însă, prezența lipidelor, fitaților și a calciului reduce eficiența absorbției de magneziu. În timpul unor activități sportive, cantitatea de magneziu eliminată prin transpirație este considerabilă.

Carența de magneziu poate duce la astm, anorexie, migrene menstruale, deficiențe de creștere, modificări de EKG, probleme neuromusculare, tetanie (convulsii), tremurături, vertij, calcificarea unor artere mici, calcificarea malignă a unor țesuturi, precum și carențe de calciu și potasiu (Altura și Burton, 1994; Dreosti, 1995).

Cu privire la toxicitatea magneziului, se poate afirma că dacă rinichii au un status morfofuncțional optim nu există toxicitate la aport mai mare de 6,0 mg magneziu per zi.

Eliminarea excesului de magneziu se face predilect pe cale renală, dar există și o eliminare a acestuia prin fecale (mai ales în cazul sărurilor formate cu unele substanțe antinutritive acide cum sunt acidul fitic, citric etc.) și prin transpirație.

Sodiul. Se găsește în organismul unui om adult în cantitate de 155 g și provine din săruri solubile de sodium, în special NaCl. Omul adult ingerează cca 8-12 g NaCl / 24 ore.

Rolul sodiului în organismul uman rezidă în reglarea presiunii osmotice, reglarea echilibrului acido-bazic, creșterea excitabilității neuromusculare, influențarea secrețiilor salivară, gastrică și intestinală, intensificarea peristaltismului intestinal, creșterea resorbției renale a apei și chiar activator al unor enzime.

Ionul de sodiu este un ion caracteristic umorilor organismului, fiind repartizat în spațiul extracelular în proporție de cca 142 mEq / L (0,3-0,35 g %), iar intracelular 10 mEq / L (0,04-0,1 g %), ceea ce reprezintă 5-10 % din totalul de sodiu din organismul uman. Diferența de concentrație de o parte și de alta a membranei celulare contribuie la menținerea potențialului electric membranar, între interiorul și exteriorul celulei.

Sodiul extracelular este neutralizat de ionul de clor doar în cantitate de 103 mEq/L, restul sodiului fiind neutralizat de ionul de carbonat acid. Bicarbonatul de sodiu are predilect distribuție extracelulară, conferind o reacție alcalină a mediului și contribuind astfel la menținerea pH-ului ușor alcalin al sângelui și lichidelor interstițiale. Rezervele de sodiu depozitate în substanța osoasă sunt mici, reprezentând 1/3 din sodiul total.

Necesarul de sodiu per zi se estimează la cca 2,4 – 3,6 g din alimente, la care se adaugă 1,5 – 2,4 g per zi sare de bucătărie folosită la prepararea unor diete.

Absorbția sodiului provenit din alimentație se face la nivelul intestinului subțire și a intestinului gros, iar la nivelul stomacului absorbția este mult mai redusă. Procesul de absorbție al sodiului în organismul uman poate fi influențat de prezența altor biominerale sau metale cu potențial toxicogen.

Eliminarea sodiului se face predilect pe cale renală, dar și prin piele și fecale. Se elimină sub formă de clorură de sodiu. Eliminarea sodiului prin urină reprezintă cca 7 g/zi la omul adult sănătos. Prin transpirație se elimină cca 2–3 g/L, dar este influențată în mare măsură de activitatea fizică depusă (crește cantitatea de sodiu eliminată proporțional cu intensitatea efortului depus) și de temperaturile mediului ambiant.

Potasiul. Se află în organismul omului adult în cantitate de 180g, ceea ce reprezintă 0,55 %. Este un element caracteristic structurilor intracelulare, quantumul acestuia fiind de 140 mEq / L (90 % din cantitatea totală), iar extracelular 4 mEq / L (10 %). Apreciind cantitatea de potasiu din umorile și celulele organismului, se constată că intracelular există 300 mg % potasiu, iar extracelular 20 mg %. Potasiul în interiorul celulelor se găsește sub forma unor combinații de proteinat de potasiu. Ionul de K^+ contribuie alături de Na^+ la realizarea unei diferențe de potențial electric membranar dintre interiorul și exteriorul celulei.

Dintre numeroasele roluri ale potasiului în organismul uman amintim: asigurarea osmolarității mediului intracelular; creșterea excitabilității neuromusculare (având efecte antagonice cu calciul); menținerea automatismului cardiac; intervine în digestia alimentelor și a unor procese metabolice; influențează activitatea unor enzime etc.

În toate stările, în care ultrastructura și funcția celulelor organismului este compromisă, are loc procesul de transmineralizare. Prin acest proces se tinde spre egalizarea diferenței electrocinetice, prin repartizarea ionilor metalici de o parte și de alta a membranelor celulare (scade quantumul potasiului și magneziului, respectiv crește sodiul intracelular). Astfel apar modificări functionale profunde.

Necesarul pentru menținerea unei stări optime de sănătate este de 2 – 4 g potasiu / zi. Absorbția potasiului se face predilect la nivelul intestinului subțire, dar cu o viteză mai mică decât în cazul sodiului. Tranzitul potasiului în organe se realizează mai rapid comparativ cu sodiul.

Hiperpotasemia poate să apară fie datorită unor stări patologice, fie administrării unor săruri de potasiu în exces. Această stare produce perturbarea echilibrului osmotic și efecte toxice în special pentru persoanele cu probleme renale, diabet sau cardiaci (Jefferson, 1992).

Eliminarea potasiului se face în cantitatea mai mare prin urină, reprezentând cca 85 – 95 % din totalul potasiului excretat. Prin fecale se elimină potasiu în proporție de 5 – 15 %, iar prin transpirație quantumul este mult mai scăzut, fiind de 2 – 3 %.

1.4.1.2. Oligo- și microelemente metalice prezente în organismul uman

În organismul uman oligoelementele metalice reprezintă cca 0,01% din totalul bioelementelor și au un rol important în manifestările funcționale ale organismului. Acestea intervin în procesele metabolice cu rol în morfogeneză. Totalul de oligoelemente și microelemente nu depășește quantumul de 150g în organismul unui adult, și nu depășește 0,25% din greutatea corpului. Deși se găsesc în cantitate atât de mică, acestea au rol biocatalitic important, ca și constituenți ai grupărilor active ale unor enzime, ale proteinelor transportoare de oxygen sau ca și efectori (activatori / inhibitori) enzimatici.

Dacă avem în vedere clasificarea oligoelementelor propusă de către Anke și Groppe acestea sunt esențiale pentru menținerea unei stări optime de sănătate. Din punct

de vedere al funcțiilor în cadrul organismul uman clasificarea cuprinde două grupe (Anke și Groppe, 1987) și anume:

- oligoelemente clasice: fier, cupru, mangan, zinc, cobalt, molibden, crom, seleniu, iod, fluor;
- oligoelemente recent recunoscute ca necesare pentru organismul uman (new trace elements): vanadiu, nichel, litiu și plumb, arsen, cadmiu, staniu, siliciu.

Simptomele deficienței acestor “oligoelemente noi” apar doar în cazul nutriției exclusiv parenterale sau în cazul unor deficiențe genetice (e.g.: molibden și mangan). Conform datelor din literatura de specialitate oligoelementele noi sunt destul de larg răspândite în alimente, astfel că nu apar deficiențe ale acestora în cazul unei nutriții optime. În acest context se citează nichelul (Anke et al., 1993a, 1993b; Klos et al., 2000), litiul (Anke et al., 1981; Kosla et al., 1995), cadmiul (Cumbrowski și Klemm, 1981; Isermann, 1992; Grosicki și Domanska, 1999), plumbul (Grün et al., 1982; Strikauska et al., 1995) și vanadiul (Anke et al., 1984; Anke et al., 1998), aceste observații nefiind o totală recunoaștere a literaturii din domeniu. Oligoelementele sunt caracterizate de un aport variat și o activitate biologică specifică fiecărui element în parte.

Fierul. A fost evidențiat la toate speciile de plante și animale. În organismul omului și animalelor există enzime oxido-reducătoare formate din metaloproteide și cromoprotide.

Fierul se găsește în cantitate de 5 g în organismul unui adult, mare parte fiind conținută în sânge sub formă de hemoglobină (65 % fier în hemoglobină, 4 % în mioglobină, 0,2 % în enzimele hemice, 0,12 % legat de transferină, cca 25% - 30% depozitat sub formă de feritină și hemosiderină). Hemoglobina are rol de transportor al oxigenului de la plămâni la țesuturi, pe calea circulației sanguine. Feritina este forma de stocare a fierului din ficat, splină și măduvă osoasă.

O altă parte a fierului se găsește în toate țesuturile și în structura fermenților cu structură de hem (citocromi, citocromoxidaza).

Fierul pătrunde sub forma sărurilor solubile de fier din mediul înconjurător în plante, unde are loc fixarea fierului pe anumite structuri proteice. Sărurile solubile din mediu și fierul de proveniență vegetală și animală pătrunde în organism odată cu alimentele. Tranzitul acestui bioelement se realizează în mai multe etape specifice translocării din sol, apă la plantă, apoi la animal, iar după aceea la om. Acest tranzit poate să aibă loc și direct din apă la om; sau direct din plantă la om (produse alimentare de origine vegetală). Procesul prin care au loc aceste transformări “proces de translocare” și este important în cercetările referitoare la poluare și contaminare.

Funcția oxiferitică a fierului se exercită în relație cu proteinele. De la pătrunderea sa în organism, fierul nu circulă liber, ci exclusiv în combinații proteice. Forma de rezervă a acestui mineral se află în ficat, splină, măduvă osoasă, unde se găsește în cantitate de aproape 1,2 g. Fierul liber este toxic, iar “blocarea fierului” cu ionul cianic produce deces în scurt timp de la ingestie.

Necesarul de fier este diferit în funcție de vârstă și sex, precum și de starea fiziologică a organismului. Astfel, la bărbat necesarul de fier este de 6,5 – 13,0 mg / zi, la femei 6,0 – 9,0 mg / zi (crescând în perioada ciclului menstrual), la adolescenți 10,0 – 20,0 mg / zi, la copii 4,0 – 10,0 mg / zi, iar la nou-născut 5,0 – 15,0 mg / zi.

Doar 10% din fierul din hem este biodisponibil pentru absorbție, în timp ce doar 1% din fierul conținut produsele alimentare de origine vegetală proaspete poate fi absorbit datorită prezenței fitaților (Nielsen, 1993). Absorbția se face în primul rând în duoden unde pH-ul mediu este încă acid. Astfel, se poate afirma că acidul clorhidric din stomac este necesar pentru o absorbție optimă a fierului. Acidul ascorbic crește absorbția fierului, iar fitații și alți acizi cu rol antiminerizant scad absorbția fierului.

Prezența fierului în exces poate conduce la ciroză hepatică, fibroză pancreatică, diabet și boli cardiorespiratorii, și uneori crește necesarul de seleniu, cupru și zinc (Pollitt, 1993).

Surplusul de fier din organism este recirculat în mod eficient. Doar cantități mici de fier (aproximativ 1 mg Fe / zi pentru un adult) se excretă prin urină sau fecale.

Un aport ridicat de fier (peste 18 mg / zi) nu este recomandat deoarece poate duce la hemocromatoză. Acest lucru însă se întâmplă rar și doar în cazul unui aport suplimentar de fier pentru perioade lungi de timp. Efectele unui aport excesiv de fier influențează sistemul imunitar. Datorită acțiunii radicalilor liberi, a căror formare este favorizată de prezența fierului, crește riscul producerii cancerului. Radicalii liberi pot "ataca" lipoproteinele cu densitate scăzută (LDL) care se vor depune pe pereții arterelor ducând la ateroscleroză.

Cuprul. Este un oligoelement reprezentat în organismul uman în proporție de 100 – 150 mg, în combinații proteice. În sânge cuantumul cuprului este de 0,09 mg / 100ml. Cuprul intră în structura ceruloplasminei din sânge, o α -2-globulină cu funcție de oxidază și a diverselor metaloproteine, cum este metalotioneina (Bremner, 1987a și 1987b), hemocupreina și cerebrocupreina (Gârban, 2001). Are rol catalitic în formarea hemoglobinei și citocromoxidazei. Prezența cuprului este menționată și la nivelul unor organe cum sunt ficatul, rinichii, intestin și pancreas.

La populația care are un aport de alimente provenite de pe un sol sărac de cupru, pot apare anemii grave. Carența ceruloplasminei sanguine cu rol în transportarea cuprului determină o îmbolnăvire gravă, interesând ficatul și sistemul nervos (degenerescenta hepatolenticulară). Necesitățile zilnice ale unui adult sunt de cca 2mg. Cuprul are o putere catalitică mare, influențând astfel activ oxidările celulare și favorizând transformarea conversă a plăcilor ateromatose în plăcile fibroase (Couzy et al., 1993).

În cazul unui aport excesiv de cupru, în organism se modifică cuantumul cuprului seric și tisular. Dacă este vorba de o intoxicație cu cupru apar modificările hepatice caracteristice în boala Wilson. Alături de aceste perturbări în excesul de cupru se menționează și alte manifestări de genul, astenie, anemie hemolitică, tulburări gastrointestinale.

Absorbția cuprului se face predilect în intestinul subțire și este influențată de fenomenele competitive dintre cupru și alte bioelemente esențiale.

Cu privire la excreția cuprului se menționează faptul că aceasta apare în general în cazul unui exces și se realizează, în principal, la nivelul rinichiului.

Manganul. Se găsește în concentrații mari în ficatul mamiferelor și a omului, activează arginaza hepatică – cu rol în ureopoeză; colinesteraza; dipeptidaza intestinală și unele enzime cu rol în glicoliză (Underwood, 1977; Sloom et al., 1994; Gârban, 1999; Vincu, et al., 2001). Manganul exercită un efect protector asupra tiaminei și participă la catalizarea combinației serină-glucozamină.

Absorbția de mangan se realizează în intestinul subțire și este relativ mică, fiind dependentă de forma chimică a manganului. Absorbția este mai intensă la animalele nou născute decât la cele tinere. De asemenea, s-a dovedit experimental că absorbția variabilă de mangan ajută la menținerea echilibrului homeostazic în organism. Fierul și manganul sunt antagoniști și rivalizează la locul de legare. Astfel absorbția unuia poate interfera cu absorbția celuilalt, acest lucru putând avea efecte adverse fapt constatat pe animalele de laborator.

Conținutul de mangan în organismul uman adult (70 kg) variază între 12-20 mg. Ficatul uman conține cca 6-8 mg / Kg mangan, raportat la substanță uscată. Acesta se acumulează semnificativ cu vârsta în plămâni, unde concentrația sa medie este de 0,22 mg / Kg. Manganul se acumulează în creier. De asemenea, concentrații mai mici de mangan se găsesc în laptele matern uman.

Manganul este excretat în mod special prin bilă, dar este posibilă și excreția directă în intestinul subțire în intestinul gros. O altă cale de eliminare a manganului este și calea renală dar în cantități mult mai mici.

În anul 1991, Committee on the Medical Aspects of Food Policy (abreviat COMA) a notat că există o oarecare toxicitate scăzută pentru mangan chiar la aporturi considerate fără probleme de sub 1,4 mg / zi pentru adulți și 16 μg / Kg corp / zi pentru copii.

Există și surse de mangan exogene nealimentare cum ar fi diverse preparate farmaceutice de tipul suplimentelor alimentare cu vitamine și minerale. Astfel pentru mangan spre exemplu suplimente alimentare care au în compoziție și mangan și care aduc un aport de 0,25 – 5,0 Mn per zi (OTC, 2001).

Departamentul pentru Alimente și Nutriție din SUA (US Food and Nutrition Board) a stabilit un aport maxim de mangan de 11 mg / zi bazându-se pe observațiile referitoare la efecte adverse la aportul de mangan din dietă (Institute of Medicine, 2001).

Se apreciază că aportul de mangan în urma consumului de produse alimentare și suplimente alimentare este diferit pe grupe de vârstă – fapt menționat în „Food and nutrient intakes of British infants” (1986) și în „1994 Total Diet Study: Metals and other elements. Food Surveillance Information” (1997).

Din studiile efectuate de “Expert Group on Vitamins and Minerals”, în 2002, se evidențiază faptul că aportul mediu de mangan a fost mai mare la bărbați decât la femei, a crescut progresiv cu vârsta și a scăzut cu vârsta pentru persoanele cu vârsta de peste 65 ani. Grupul de persoane cu vârsta de peste 65 ani cu 6 % bărbați și 11 % femei din aceeași comunitate și 8 % bărbați și 12 % femei instituționalizate au avut un aport sub cel minim recomandat pentru adulți, adică sub 1,4 mg Mn / zi.

Zincul. Este un element esențial pentru organismul uman și animal. Doza zilnică recomandată de către Washington National Research Council – NRC este de 15 mg pentru bărbați adulți, 12 mg pentru femei adulte, 15 mg pentru femei însărcinate, 19 mg pentru femei care alăptează în primele 6 luni și 16 mg pentru femeile care alăptează copii de 6 – 12 luni. De asemenea, s-a stabilit că doza recomandată pentru zinc este de 10 mg pentru copii de peste 1 an și 5 mg pentru copii de la 0 la 12 luni (după NRC, 1989).

Zincul este prezent în toate țesuturile, dar concentrații mai mari se află în prostată (Bertholf, 1988), iar concentrații mai reduse s-au decelat și în rinichi, ficat, cord și pancreas (Stokinger, 1981a).

Absorbția intestinală a zincului este variabilă, fiind de 20 – 80%. Aceasta depinde de caracteristicile chimice ale compusului, de cantitatea de zinc din organism, dar și de concentrația de zinc din nutriția din dietă. Astfel, concentrații ridicate de fier, calciu sau fosfor reduc absorbția zincului, iar proteinele cresc absorbția zincului (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1989). La indivizii cu concentrații normale de zinc în organism absorbția gastrointestinală este de 20 – 30%. În ceea ce privește absorbția zincului la nivel pulmonar aceasta este limitată și complicată prin absorbția potențială gastrointestinală urmată de clearance-ul mucociliar și de ingestia cantitativă a acestuia.

După absorbția în organism, zincul se leagă de diverse complexe proteice, dintre care cel mai important este metalotioneina, care acționează ca un transportator al zincului (Opresko, 1992). Zincul nu este metabolizat ca atare, dar este un component esențial al unor metaloenzime cum ar fi anhidraza carbonică – care are rolul de a regla schimbul de dioxid de carbon (Stokinger, 1981b).

Alte sisteme enzimatice în care zincul joacă un rol esențial sunt RNA-polimeraza, superoxid dismutaza, carboxipeptidaza, izocitric dehidrogenaza, alcool dehidrogenaza și ceruloplasmina (Opresko, 1992).

Mecanismele homeostatice de la nivelul organismului animal sau uman controlează absorbția și excreția zincului. Metalotioneina (legată de zinc) din celulele mucoale tapetează tractul gastrointestinal și reglează astfel concentrația zincului în organism (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1989). În condițiile fiziologice în care există un exces de zinc în organism, complexul metalotioneină – zinc este eliminat. Bilanțul concentrației de zinc din

organism indică faptul că cea mai mare cantitate de zinc este excretată prin fecale, cantități mai mici prin urină, transpirație (Schroeder et al., 1967). Literatura de specialitate din domeniu arată că în zonele cu temperaturi foarte ridicate o cantitate însemnată din zincul din organism se pierde și prin transpirație (Prasad et al., 1963).

Se estimează că necesarul de zinc este de 12 mg / zi la femei și 15 mg / zi la bărbați, iar în cazul femeilor însărcinate necesarul crește la 15 mg / zi.

La om toxicitatea acută prin ingestia zincului provoacă grețuri, stare de vomă, crampe abdominale și în unele cazuri sângerări la nivelul stomacului (Moore, 1978). Ingestia de clorură de zinc afectează cavitatea bucală și gâtul, faringele, esofagul (Chobanian, 1981). Fosfatul de zinc, eliberează pentaoxid de fosfor (P_2O_5) gazos în condițiile acidității din stomac, poate conduce la tulburări ale cardiace, pulmonare, renale, (Mack, 1989).

Expunerea cronică la zinc duce la anemie hipocromică microcitică asociată cu hipoceruloplasminemie, hipocupremie și la unii indivizi neutropenie (Prasad et al., 1978). Dozele de referință pentru expunerea cronică la zinc sunt cele date de către United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA), iar doza de referință (RfD) atât pentru expunerile cronice cât și pentru cele subcronice este de 0,2 mg / Kg corp / zi, doză care se bazează pe date experimentale clinice care demonstrează că zincul induce deficiențe de cupru și anemie la pacienții care ingeră zilnic sulfat de zinc pentru tratamentul anemiei drepenocitare (sickle cell anemia) – U.S. EPA, 1992. Pentru ingestia orală cronică de fosfat de zinc doza de referință (RfD) este 0,0003 mg / Kg corp / zi (U.S. EPA, 1991), iar RfD pentru expunerea subcronică este de 0,003 mg / Kg corp / zi (U.S. EPA, 1992).

Molibdenul. Este constituent al xantinoxidazei și xantindehidrogenazei (enzime flavinice), care intervine în metabolismul acizilor nucleici. De asemenea, molibdenul este constituentul și al altor enzime cum sunt: aldehydoxidaza, sulfioxidaza și chir nitratreductaza (importantă pentru declanșarea producerii de radicali liberi bogați în oxigen).

Concentrația acestuia în organismul uman și în țesuturi este variabilă, fiind reprezentat astfel: în ficat 3,2 $\mu\text{g/g}$; rinichi 1,6 $\mu\text{g/g}$; splină 0,20 $\mu\text{g/g}$; plămâni 0,15 $\mu\text{g/g}$; creier 0,14 $\mu\text{g/g}$; mușchi 0,14 $\mu\text{g/g}$. Cuantumul molibdenului în sângele uman variază în funcție de zona geografică, dar cea mai mare parte se găsește în globulele roșii (hematii) și anume 70%.

Necesarul de molibden pentru organismul uman este estimat la mai puțin de 100 μg / zi provenind din alimente (valoare estimată la greutatea uscată). Acest cuantum depinde de vârstă, sex, precum și caracteristicile mediului înconjurător, e.g.: concentrația altor bioelemente metalice și a metalelor cu potențial toxicogen din sol, apă, aer (Anke și Groppe, 1987). Un rol deosebit de important în cuantumul de nichel ingerat este dat de obiceiurile alimentare. Astfel, o dietă mixtă furnizează cantități de nichel mai mari decât o dietă vegetariană (Holzinger et al., 1998).

Aportul insuficient de molibden se manifestă clinic ca o carență de sulfioxidază și include iritabilitate, care în final conduce la tahicardie, slăbirea vederii pe timp de noapte, boala Crohn etc.

Metabolismul molibdenului este influențat de prezența wolframului și cuprului care au efecte antagonice cu molibdenul.

Absorbția molibdenului se face la nivelul intestinului subțire, iar excreția acestuia are loc predilect pe cale renală.

Cobaltul. S-a decelat sub forma combinației complexe cian-cobalamină (vitamina B_{12}), care prezintă cca 4 % din cobaltul total și se găsește depozitat în ficat, circulând în sânge fixat pe o α -2-globulină, cu rol transportor. Cobalamina intră în structura unor enzime, care include în metabolism radicali conținând un singur atom de carbon. Participă astfel la metilarea colinei și timinei, având rol în sinteza acidului deoxiribonucleic.

Conținutul total al omului adult de 70 kg este de 1,1 mg cobalt, având următoarea distribuție în organele omului: ficat 1,18 mg / Kg substanță uscată; în splină 0,09 mg / Kg; în rinichi 0,23 mg / Kg; în irimă 0,10 mg / Kg și 0,06 mg / Kg în pancreas.

Cobaltul este implicat în bolile cardiovasculare. Influența sa a fost dovedită și în cazul producerii de cardiopatii la marii băutori de bere. Cobalt (sub formă de sare) în concentrație de 3 mg per 450 g bere se folosește la stabilizarea spumei de bere și astfel la "marii consumatori fideli" apar cardiopatii (Mănescu et al., 1996).

Deficitul de cobalt (și implicit al vitaminei B₁₂) are grave repercursiuni asupra creșterii și maturării elementelor celulare sanguine, dar în primul rând al eritrocitelor (anemie melaloblastică, denumită și anemie pernicioasă). Un efect particular al carenței de vitamină B₁₂ este demineralizarea cordoanelor medulare.

Necesarul de cobalt se estimează prin prisma cuantumului de vitamină B₁₂, fiind de cca. 3 mg vitamină B₁₂ / zi.

Cu privire la absorbția cobaltului în organismul uman, aceasta se realizează la nivelul intestinului subțire (duoden) și este influențată de pH-ul gastric. Carența de fier determină o absorbție crescută de cobalt.

Eliminarea excesului de cobalt se face în special pe cale renală.

Cromul. Este prezent ca și constituent normal în organism, intervenind în metabolismul glucidic și lipidic. Cantități mici de crom sunt ingerate zilnic odată cu apa și alimentele. Distribuția acestuia în organism determină o acumulare mai mare în creier, fanere, piele și grăsime. În cord concentrația cromului este relativ mică.

S-a demonstrat experimental de diverși autori că șobolanii cu carență de crom prezintă o scădere a toleranței la glucoză, o creștere încetinită, o reducere a duratei de viață și o colesterolemie ridicată (Țurcanu, 1978).

În organismul uman concentrația cromului scade cu vârsta în toate țesuturile. Acest fapt este asociat cu reducerea progresivă cu vârsta a toleranței la glucoză, care se pare a avea rol etiologic în diabetogeneză. S-a observat că bolnavii diabetici prezintă o scădere a concentrației de crom la nivel hepatic.

Variațiile concentrațiilor de crom în diversele surse au dependență geografică și se referă predominant la concentrațiile de crom în apa potabilă.

Cromul accelerează catabolismul colesterolului și deci reduce nivelul acestuia. Din această cauză carența de crom din alimentație (i.e.: zahărul rafinat) poate conduce, în timp, la apariția aterosclerozei.

Carența de crom conduce la scăderea glucozei serice, hiperinsulinemie, hipercolesterolemie, creșterea concentrației trigliceridelor serice, hiperiritabilitate, depresii, tulburări maniaco-depresive, dificultăți de învățare, boala "Bi-polar", boli cardiovasculare, infertilitate (Nielsen, 1993; Lipko et al., 2002).

La om cromemia este de 10 μg %, iar cromuria este de 10 μg / L urină. În condițiile expunerii profesionale la concentrații mai mari de crom sau derivați ai acestuia, calea principală de pătrundere în organism este respiratorie. Însă cantități mai mici de crom pot traversa și tegumentul intact, sau pot fi absorbite și prin tractul digestiv.

Absorbția cromului este în general redusă, fiind mai mare în diverse afecțiuni: anaclorhidrie, anemie pernicioasă etc.

Transportul sanguin al cromului se face pe hematii în care se presupune că formează un complex cu hemoglobina. După încorporarea cromului de către hematii, acesta se depozitează preferențial în pulmon și ficat (unde poate persista până la 8 ani), precum și în alte organe (Țurcanu, 1978).

În organism cromul hexavalent se reduce la crom trivalent, în mod preferențial în mediu acid, ceea ce este considerat echivalent cu un proces de inactivare (cromul bi- și trivalent au toxicitate redusă).

Eliminarea cromului se face lent pe cale renală și prin tubul digestiv (fecale). Se presupune că și pielea este o cale de eliminare a excesului de crom.

Compușii hexavalenți ai cromului sunt iritanți și caustici pentru piele și mucoase și precipită proteinele tisulare. Proteinele denaturate datorită cromului se presupune că devin antigenice sau o altă ipoteză este că unii compuși ai cromului s-ar cupla cu proteinele cutanate jucând rol de haptenă, mecanism care ar explica efectul de alergizare indus de crom.

O expunere prelungită la concentrații mari de crom duce chiar la apariția unor simptome carcinogene.

Nichelul. Este destul de larg răspândit în natură. Astfel, distribuția cantitativă a nichelului este variată, în apa de suprafață estimându-se un quantum de cca 0,01 mg / Kg, în apa mărilor cca 0,0054 mg / Kg, în sol aproximativ 40 mg / Kg (cu concentrații mai mari în solurile din apropierea șoselelor cu serpentine), în plantele marine cca 3 mg / Kg, în plante în jur de 3 mg / Kg, în animale marine 0,4-25 mg / Kg și în animale cca 0,8 mg / Kg.

Funcțiile nichelului în organismul uman sunt de cofactor al unor metaloenzime și facilitarea absorbției de fier, magneziu și zinc. Carența de vitamină B₁₂ conduce la creșterea aportului de nichel atât la animale cât și la om. Nichelul intervine în metabolismul aminoacizilor și al acizilor grași. Studii de specialitate au demonstrat că deficiența de nichel la șobolani conduce la: anemie, depresia reacțiilor de oxidoreducere la nivelul ficatului, depresia absorbției zincului, scăderea colesterolului plasmatic, mortalitatea crescută la nou născuți, căderea părului și deshidratarea excesivă a părului, dermatite.

Se estimează că necesarul de nichel este de cca 25-35 μg / zi (Anke et al., 1995). Din totalul aportului de nichel, metalic mai puțin de 10% este absorbit (Nielsen, 1993).

Datorită faptului că nichelul este folosit pe scară largă în industrie acesta este considerat a fi un poluant major al mediului înconjurător. Din acest motiv studiile referitoare la esențialitatea nichelului pentru organismele vii sunt relativ mai recente.

Toxicitatea nichelului se manifestă inițial prin alergii și mai apoi prin acțiunea asupra pulmonului, în special atunci când se vorbește de pătrunderea în organism pe cale respiratorie.

Absorbția nichelului în organismul uman se face similar cu restul microelementelor la nivelul intestinului subțire.

Eliminarea excesului de nichel se produce în cea mai mare parte prin fecale (peste 85%) și în cantități mai mici prin urină și transpirație.

Vanadiul. Se regăsește în natură în concentrații de cca 0,001 mg / Kg în apa de suprafață, în apa de mare 0,002 mg / Kg, în sol 100 mg / Kg (vanadiul este absorbit din solurile alcaline în special de humus), în plantele marine 2 mg / Kg, în plante 1,6 mg / Kg, în animalele acvatice 0,14 – 2,00 mg / Kg și animalele 0,15 mg / Kg. Absorbția “vanadiului metallic” (sub formă de sulfat de vanadiu) se face la nivelul intestinului subțire și doar în procent de 0,1 până la 1,0 % din totalul vanadiului din organism. Absorbția vanadiului chelatat are loc în proporție de 40 %, iar vanadiul din sistemele coloidale se absoarbe în intestin în proporție ridicată – până la 98 % (Nielsen, 1993).

Vanadiul stimulează oxidarea glucozei și sinteza glicogenului în ficat și în mușchi, inhibă gluconeogeneza din ficat (formarea glucozei din compuși neglucidici) și inhibă absorbția glucozei din intestin (Dehghani et al., 1997; Tsunajima et al., 1997; Yuan et al., 1997a; Yuan et al., 1997b; Verma et al., 1998). Vanadiul are rolul de a intensifica efectul insulinei asupra sintezei DNA. În ciuda unui quantum redus de insulină în sânge, concentrația glucozei din sângele șobolanilor diabetici la care s-a administrat vanadiu a fost aceeași ca și la șobolanii din lotul de control care nu erau diabetici. Astfel, se poate afirma că vanadiul acționează analog cu insulina (“insulin-like”) prin alterarea funcțiilor celulelor membranare în transportul ionilor. Din acest motiv vanadiul are un efect benefic pentru persoanele cu probleme de toleranță la glucoză: hipoglicemie, hiperglicemie și hiperinsulinemie (Shamherger, 1996).

La animale și la oameni s-a demonstrat experimental că vanadiul inhibă sinteza colesterolului, proces care rezidă în scăderea nivelului plasmatic de colesterol și reducerea colesterolului aortic. De asemenea, vanadiul inițiază o creștere a forței contractile a mușchiului cardiac, cunoscută sub denumirea de "efect inotropic".

Vanadiul are proprietăți anticarcinogenice. Astfel, la inducerea unor tumori mamare la șoareci a fost stopată creșterea tumorilor prin administrarea a 25 μg vanadiu / g dietă. Suplimentarea dietei cu vanadiu a redus incidența tumorilor, a redus media numărului de tumori per animal fără să inhibe creșterea sau starea de sănătate a animalelor (Nielsen, 1993).

Cu privire la enzime, vanadiul are rolul de a regla schimbul de ioni Na^+/K^+ în complexul enzimatic ATP-aza, adenilat ciclaza și protein kinaza. Mecanismele biochimice, nsă, nu sunt elucidate.

Carența de vanadiu determină întârzieri de creștere și tulburări gastro-intestinale (Anke et al, 1984).

Nu există date referitoare la necesarul de vanadiu pentru organismul uman. Astfel, cuantumul de vanadiu prezent în dieta obișnuită pare să satisfacă necesarul de vanadiu. Media zilnică – în consum alimentar – de vanadiu în SUA este de aproximativ 20 μg (Nielsen, 1993). Cu privire la stabilirea necesarului de vanadiu, deficiența de vanadiu nu a fost identificată la persoanele care au avut un aport de vanadiu din dietă mai mic de 30 μg zilnic și mici sub 15 μg vanadiu zilnic. Pornind de la aceste date experimentale se sugerează faptul că un aport de 10 μg vanadiu satisface necesarul zilnic.

Ingestia unor doze de vanadiu care depășesc cu mult necesarul nutrițional este asociată cu manifestări maniaco-depresive, iar doze foarte mari de vanadiu sunt toxice pentru organism (Drebickas și Zabulyte, 1997).

Litiul. Se găsește în concentrații de 0,0011 mg / Kg în apa de suprafață, 0,18 mg / Kg în apa mărilor, 30 mg / Kg în sol, 5 mg / Kg în plantele marine, 0,1 mg / Kg în plante, 1 mg / Kg în animalele marine și 0,02 mg / Kg în animale (Nielsen, 1993).

Studiile realizate pe animale de experiență au arătat că deficiența de litiu duce la infertilitate, întârzierea creșterii, scurtează speranța de viață și în general la probleme de comportament (Pickett, 1983; Pickett și O'Dell, 1992). La oameni carența duce la depresii, manifestări maniaco-depresive, boala "Bi-polar" și hiperaciditate.

Nu s-au găsit date referitoare la necesarul cert de litiu pentru organismul uman, dar s-au făcut diverse studii legate de esențialitatea și toxicitatea acestuia (Anke et al., 1997a; Schäfer, 1997). Astfel, nu au fost găsite încă enzime sau proteine litiu-dependente și nici hormoni litiu-dependenți, dar se pare că litiul intervine în replicarea DNA.

Aportul de 250-500 μg litiu / zi la adulți necesită monitorizarea cunatumul de litiu, deoarece limitele maxime admise pentru ingestia de litiu nu sunt clar stabilite. Funcția de baza a litiului și modul de acțiune în organism nu sunt cunoscute, în ciuda multiplelor experimente care s-au făcut în acest domeniu. Concentrațiile de litiu din unele țesuturi, chiar și în urma unei deficiențe prelungite, nu s-au modificat față de control, excepție făcând glandele endocrine și unele regiuni din creier. Se pare că litiul protejează organismul cu privire la apariția boala Alzheimer.

Efectele toxice induse de un aport excesiv de litiu se manifestă prin hipertensiune, tremor, vertij și proteinurie.

Trebuie subliniată importanța bioelementelor metalice ca și constituenți ai materiei vii sau ca și efectori biochimici în procesele metabolice fără de care nici o ființă vie nu ar putea supraviețui în condiții optime. Perturbarea homeostaziei unuia dintre bioelementele metalice de bază datorită translocării sau a unor procese patobiochimice poate duce la dezechilibrarea balanței dintre necesarul și aportul de elemente cu implicații fiziopatologice (Gârban, 1999).

1.4.2. Efectele biochimice ale unor metale cu potențial toxicogen

Aluminiul. Este elementul chimic prezent în minerale, fiind prezent în cantități relativ crescute după oxigen și siliciu. Acest element se găsește în mediu sub diverse forme chimice.

De asemenea, ionul aluminiu (Al^{3+}) este un agent insuficient cunoscut, care contribuie la instalarea în organismul uman a unor boli (e.g. osteomalacia, anemia, demența etc.).

Studii și cercetări diverse demonstrează că acest element metalic perturbă procesele de creștere și dezvoltare ale plantelor. Așa cum s-a precizat mai sus, aluminiul este un element preponderent în scoarța terestră și astfel poate fi absorbit în rădăcina plantelor și apoi în restul celulelor. Dacă urmărim procesul translocării în succesiunea sol-plantă-animal-om, se poate observa că acest element accede în organism prin alimente de origine vegetală (considerată cale directă) și prin alimentele de origine animală (considerată cale indirectă).

Plantele acumulează ionul Al^{3+} din solurile cu pH acid. Cu ionul Al^{3+} se formează chelați, care detoxifică astfel organismul și prevenind formarea un quantum crescut de aluminiu.

În organismul uman sănătos quantumul de Al^{3+} în serul sanguin este mai mic de $0,4 \mu\text{mol}$. După o ingestie acută de compuși care eliberează Al^{3+} chiar la adulții sănătoși se poate acumula aluminiu ionic în oase. De asemenea, Al^{3+} cauzează sau ajută la apariția unor boli (exemplu boala Alzheimer).

Un studiu recent arată că la pacienții supuși hemodializei o concentrație a serului de peste $1,5 \mu\text{mol } Al^{3+}$ crește riscul mortalității și aproximativ 40% din pacienți prezintă quantumuri mai mari de $1,5 \mu\text{mol } Al^{3+}$ în ser (Nicolini et al, 1991).

Prezența aluminiului în mediul înconjurător este reprezentată de combinații chimice diverse. Astfel, în apa mărilor și oceanelor se găsește sub $1 \mu\text{g } Al/l$, în precipitații – cu predilecție în ploile acide; în apa lacurilor, când la pH mai mic de 6 apar concentrații de câțiva $\mu\text{mol } Al^{3+}$ (Nicolini et al., 1991; Diaconu et al. 1996).

În scoarța terestră aluminiul se prezintă doar în combinații cu alți compuși minerali: silicați (feldspat, granit, bazalt), hidroxizi (bauxite), oxizi (impuri – șmirghel, puri – compuși colorați, rubin, safir). Cu ionii fosfat se formează săruri insolubile, acesta fiind și motivul pentru care se utilizează fosfații în scopul fertilizării solurilor cu conținut ridicat de aluminiu.

În frunzele de ceai ajunse la maturitate s-au găsit concentrații de 3% Al^{3+} , iar în frunzele abia formate doar 0,01% Al^{3+} . Infuziile de ceai conțin aproximativ de 50 de ori mai mult Al^{3+} decât infuzia de cafea. Combinarea ceaiului cu lapte “blochează” Al^{3+} sub formă de fosfat insolubil, pe când adăugarea de lămâie în ceai determină formarea unui complex de tip citrat cu Al^{3+} .

Când aluminiul pătrunde în organismele vii răspunsul toxic apare chiar și la concentrațiile mici ale acestui element. Totuși, biodisponibilitatea aluminiului este controlată prin concentrația siliciului. Echilibrul dintre cele două elemente în mediul înconjurător este important și, în particular, nu poate fi neglijat în ceea ce privește problema bolilor epidemiologice în care este implicat aluminiul (Sabbioni et al, 1993).

Efectul adității de fier sau aluminiu arată faptul că aluminiul concurează cu ușurință fierul la legarea de enzime. Legătura chimică a aluminiului este inhibată în totalitate când este prezent hidroxidul de siliciu – $Si(OH)_4$.

Un mecanism important care trebuie avut în vedere, rezidă în faptul că aluminiul intră în competiție cu magneziul blocând legăturile chimice. Este cunoscut faptul că aluminiul influențează activitatea kinazelor, polimerazelor, a unor proteine și a altor sisteme ce necesită magneziu. Acest lucru se poate explica prin faptul că legăturile chimice cu aluminiu sunt mai puternice decât cele cu magneziu (e.g. legarea aluminiului la ATP este de 10^7 ori mai puternică decât a magneziului). Astfel cantități de ordinul nmol-ilor de aluminiu poate

concura cu cantității de μmol magneziu. Rata schimbului de liganzi este deseori importantă în manipulările biochimice în care magneziul și calciul sunt metale cu rol de co-factori esențiali. Odată ce aluminiul se leagă, rata schimbului de ligand este de 10^4 ori mai mică decât cu magneziul și de 10^7 ori mai mică decât cu calciul.

În mod normal se ingeră cca 2-3 mg Al din sursele de hrană care au ca aditivi compuși ce conțin aluminiu. Astfel, aluminiul este utilizat ca și filant al unor cașcavaluri, este constituent major al prafului de copt și este folosit în tratarea fructelor tip grapefruit conservate în cutii metalice pentru obținerea unei pectine de calitate (Pulley et al, 1944). În plus, aluminiul este adăugat în mod curent în apă în cazul tratării apei potabile (municipale) pentru a facilita eliminarea turbidității prezente în apă. Această fază poate lăsa reziduri de până la 5 mg / L apă. Cantități mici de aluminiu sunt absorbite în mod normal din tractul gastrointestinal (5-10 μg / zi) și sunt eliminate în principal prin rinichi. De asemenea, aluminiul inhalat în plămâni este eliminat în mare parte prin expirație, însă cantități mici sunt reținute și stocate în țesuturile pulmonare. Acest lucru este susținut de faptul că uneori concentrația aluminiului pulmonar este mult mai mare decât în alte țesuturi, crescând cu vârsta, deci nu există nici o corelare între concentrația aluminiului în pulmon și în alte țesuturi.

În cazul unui aport de aluminiu mai mare decât doza recomandată apar concentrații crescute de aluminiu la nivel de ficat, creier, femur și în sânge (Ondreicka et al., 1966).

Aluminiul poate ajunge în organismul uman și prin alimentele ingerate. Cuantumul acestuia depinde de concentrația inițială (e.g.: materiile prime), dar și de modul de pregătire culinară. Astfel, studiile efectuate în acest sens arată că organismul uman sau animal ingerează cca 20-40mg Al/zi din alimente, iar concentrația în aluminiu a produselor alimentare poate crește atunci când pregătirea culinară se face în vase de aluminiu (Delves, 1990).

Absorbția aluminiului este explicată prin combinația care pare a avea cea mai mare influență în cadrul acestui proces și anume administrarea unui compus solubil ce conține aluminiu în asociație cu deschiderea unei joncțiuni mici între celulele intestinale mici. (ex. administrarea de citrat de aluminiu).

Datorită formării fosfatului de aluminiu insolubil (AlPO_4) în tractul gastrointestinal doar o cantitate mică din aluminiul administrat oral (sub formă de sare) este absorbit (după WHO Technical Report Series No. 617, 1977).

Studii recente arată că la indivizii sănătoși care folosesc în mod frecvent citrat de calciu (printr-un aport suplimentar de calciu) s-a intensificat procesul de absorbție a aluminiului din sursele unei diete normale.

Alți factori cum sunt: vitamina D; hormonul paratiroidian și cuantumul de fier din organism, au fost caracterizați ca fiind indici ce influențează absorbția aluminiului.

Activitatea chimică a aluminiului ionic este relativ simplă:

- are o viteză de reacție de 10^7 ori mai mare decât Cr^{3+} ;
- este mult mai solubil decât Fe^{3+} ;
- se oxidează în sistemele biologice.

Aluminiul metalic este prea reactiv pentru a fi găsit liber în natură și este scos cu greu din minereuri. Acesta este motivul pentru care aluminiul ionic nu participă la reacții de oxido-reducere în sistemele biologice.

După cum s-a afirmat mai sus, aluminiul se elimină în mare parte prin rinichi, iar prin bilă foarte puțin (aproximativ 1%).

Un studiu pe animale de experiență a urmărit comportarea șobolanilor la o dietă de 2835 mg / kg aluminiu (sub formă de sulfat) timp de 8 zile. La finea experimentului s-a observat o creștere a ingestiei de aluminiu care a condus implicit la scăderea aportului de hrană (de la 20 la 15 g / șobolan / zi) și la o reducere a greutateii corporale. Aluminiul în acest caz a fost excretat în cantități mai mari prin fecale (aproximativ 70%), iar retenția aluminiului în organism a crescut cu 20 % față de control (Ondreicka et al., 1966).

Toxicitatea aluminiului s-a demonstrat și prin studii experimentale efectuate pe animale de laborator. În urma cercetărilor efectuate pe animale de laborator, după stabilirea unor aspecte legate de mecanismul toxicogen, cercetările au fost extinse și în sfera medicală. Astfel, investigațiile efectuate asupra unor pacienți supuși dializei au vizat conținutul calitativ și cantitativ al lichidului de perfuzie din punct de vedere al conținutului în aluminiu. Rezultatele obținute au arătat că lichidul de perfuzie conținea aluminiu în concentrații mai mari de $0,5 \mu\text{mol} / \text{L}$. Concentrația plasmatică poate crește peste limitele normale (sub $1 \mu\text{mol} / \text{L}$) la aproximativ $5 \mu\text{mol} / \text{L}$. În aceste cazuri s-a observat că aluminiul s-a acumulat și concentrat în diferite țesuturi ale unor organe (i.e. rinichi, ficat, oase, creier și cord), favorizând instalarea unor stări patologice. Astfel s-au semnalat encefalopatia de dializă în care există demineralizarea colagenului preosotă de dureri osoase și fracturi spontane și anemia microcitară care nu răspunde la terapia cu fier. Aluminiul se localizează și în cord și se presupune că acesta este un factor ce contribuie la hipertrofia cardiacă observată adesea la pacienții supuși hemodializei (Nicolini et al., 1991).

Întrebarea majoră care se desprinde din constatările existente este legată de mecanismul toxicității celulare care se manifestă odată cu pătrunderea aluminiului în celulă.

Aluminiul poate fi toxic pentru sistemul nervos, osos, hematologic la om, putând afecta și funcția renală. S-a demonstrat prin experiențe de laborator, că aluminiul provoacă neurotoxicitate la anumite specii de animale: pisici, iepuri. Patogeneza bolii Alzheimer este un aspect care sugerează și susține teoria că aluminiul ar fi implicat în procese biomedicale (Haiduc, 1997).

Toxicitatea aluminiului asupra sistemului osos este caracterizată de osteomalacie, dureri osoase, fracturi patologice (spontane), lipsa unui răspuns pozitiv în terapia cu orice formă de vitamina D.

Toxicitatea hematopoetică se poate explica prin toxicitatea sistemului hematologic. S-au semnalat cazuri de anemie hipocromă și microcitară în situația unui aport normal de fier și s-a demonstrat experimental că aluminiul poate provoca anemie la șoareci și șobolani. Anemia răspunde rapid la chelatarea aluminiului cu deferoxamină.

Datele din literatura de specialitate arată că toxicitatea diferiților ioni metalici asupra unor plante de cultură determină obținerea unei recolte mult mai mici. Aluminiul, ca ion metalic cu potențial toxicogen este absorbit în rădăcinile plantelor producând schimbări morfologice (Rannet și Chan, 1981; Goodwin și Mercer, 1983).

Grupele de populație ce prezintă riscul unei posibile intoxicații cu aluminiu sunt pacienții cu boli renale, dar și indivizii cu funcții renale bune, dar cărora li s-a administrat parenteral compuși pe bază de aluminiu pe o perioadă de timp mai îndelungată.

În mod curent, o sursă potențială de intoxicare cu aluminiu poate fi administrarea orală a unor compuși cu aluminiu în cazul unor indivizi cu probleme renale cronice pentru reducerea absorbției fosfaților din tractul intestinal pentru a preveni hiperfosfatemia. Astfel, se utilizează carbonat și acetat de calciu ca și înlocuitor ai compușilor cu aluminiu.

În oricare din cazuri, pentru a preveni intoxicarea cu aluminiu a pacienților cu probleme renale se impune controlarea periodică a concentrației aluminiului din plasmă și ser, iar dacă aluminiul plasmatic excede $40-50 \mu\text{g} / \text{L}$ dozarea compușilor cu aluminiului trebuie modificată.

Cadmiul. Deși pare a fi un oligoelement neesențial, practic absent la naștere, el se acumulează în țesuturi cu vârsta, datorită turnover-ului său deosebit de lung (aproximativ 50 de ani). Organismul unui individ, neexpus unei contaminări profesionale, conține $20 - 30 \text{ mg}$ Cd, dintre care $50 - 75 \%$ în rinichi și ficat. La muncitorii expuși oxidului de cadmiu pulbere, valorile în urină variază între $0,04 - 0,42 \text{ mg}$ cadmiu / L, cu o localizare inițială în plămâni, urmată de o redistribuire în întreg organismul și o acumulare în concentrații de $10 - 100$ ori peste normal, în rinichi și ficat.

Deoarece organismul nu dispune de mecanisme homeostatice de reglare a concentrației tisulare a cadmiului la aporturi diferite, nivelul său total este dependent direct de aport.

Conținutul ficatului, rinichilor și părului în cadmiu poate constitui un indicator important în profilaxia tulburărilor care ar putea fi provocate de acest element. Căile de contaminare ale organismului uman sunt strâns legate de absorbția prin alimente, apă și mediu înconjurător.

Absorbția cadmiului are loc pe cale digestivă și respiratorie. Din cantitatea de cadmiu ingerată numai o parte, 5 – 10 % este absorbită în duoden, ileon și jejun, aceasta depinzând de doză, vârstă, factori dietetici (aportul de proteine, calciu, vitamina D și alte oligoelemente – în special zincul).

În funcție de starea fizică a substanței, concentrația cadmiului absorbit prin inhalare este mult mai ridicată și variază între 10 – 40 %, iar după 30 minute de la inhalare cadmiul apare în ficat și rinichi.

Cadmiul care accedează pe cale digestivă se acumulează, în special în rinichi și ficat și are o perioadă biologică de acumulare foarte lungă, care variază între 18 – 23 ani.

În organism, cadmiul este legat mai ales de metalotioneină, proteină existentă în cantități mari în ficatul animalelor expuse la cadmiu și în proteine analoage din mucoasa gastrointestinală și cortexul renal, cu rol important în transportul și stocarea selectivă a cadmiului.

Eliminarea cadmiului are loc preponderent prin fecale și este dependentă de cantitatea ingerată pe cale orală sau administrată parenteral. În exces de aport, cadmiul se poate elimina și pe cale renală. Eliminarea prin lapte a cadmiului este extrem de redusă și nedetectabilă și de asemenea, transferul cadmiului placentar este redus.

Toxicitatea cadmiului s-a studiat predilect în intoxicații acute. Astfel, intoxicația acută cu cadmiu, ca urmare a inhalării lui consecutive timp de 5 – 7 zile în medii contaminate, se manifestă prin iritație bronhică, tuse, cu o mortalitate de aproximativ 15 %. Intoxicațiile acute, ca urmare a ingerării digestive, sunt mult mai rare.

În intoxicațiile subacute și cronice apare pigmentarea galbenă a smalțului dentar, astenie, tulburări digestive, leziuni renale și osoase.

Eliminarea renală a β -2-microglobulină poate fi corelată cu expunerea la cadmiu și utilizată în scop de diagnostic.

Utilizarea ca hrană a orezului crescut în orezării irigate de apa unui râu poluat cu cadmiu, provenit de la o uzină de zinc, a provocat în Japonia boala numită "Itai-itai", caracterizată printr-o proteinurie, o fragilitate mare a oaselor și o eliminare renală crescută a cadmiului.

Unele efecte toxice ale cadmiului pot fi diminuate de seleniu, zinc, cobalt, calciu și de substanțe care conțin grupări tiolice. De asemenea, metabolismul cadmiului este mult afectat de administrarea de zinc, cupru, calciu și alte metale, cadmiul influențând la rândul său metabolismul zincului, cuprului și fierului (Grecu et al., 1982).

Expunerea la concentrații mai mari de 30-50 μ g cadmiu per zi în cazul persoanelor adulte a fost corelată cu un risc crescut de fracturi ale oaselor, apariția cancerului, disfuncții ale rinichiului și chiar hipertensiune. De asemenea, s-a observat și o rată a mortalității crescute în cazul unor intoxicații cu cadmiu datorită instalării insuficienței renale (Satarug et al., 2003).

Mercurul. Este un metal greu, singurul metal lichid la temperatura camerei, care emite vapori și la 0°C. În natură se găsește în stare elementară (mercur lichid sub formă de geodă în mine), dar mai ales sub formă de sulfură (HgS) denumit și cinabru – din care se extrage mercur prin încălzire la temperaturi de 500-600°C. În sol și în apă se găsește în concentrații mici de 0,005-0,25 mg / Kg.

În agricultură și industrie se utilizează pe scară largă mercurul sub formă metalică, anorganică și organică. Astfel, pentru industria chimică se folosește mercur metalic în vederea confecționării unor aparate de laborator. Compușii anorganici ai mercurului se folosesc în

industria coloranților, iar compușii organici ai mercurului sunt utilizați în industria chimică ca și catalizatori ai unor reacții chimice și ca substanțe pesticide (fungicide, ierbicide etc.).

Utilizarea mercurului și a compușilor săi anorganici și organici în agricultură pentru dezinfectarea semințelor și combaterea multor boli ale tuberculilor și a bulbilor a condus la contaminarea crescândă a mediului înconjurător. Deși conținutul mercurului în atmosferă este sub 1 mg / Kg, cel mai mare pericol în poluarea atmosferică cu mercur sunt emanațiile vulcanice și arderea cantităților mari de cărbuni.

Ținând seama de conținutul mercurului în apa mărilor și oceanelor, evaluat la 0,15 μg/l, principalul risc ecologic declanșat de mercur și compușii săi îl reprezintă deversarea apelor industriale. Mercurul din sol și apă, este convertit de microorganisme în metilmercur, care se acumulează în biosferă. Astfel, microorganismele anaerobe pot transforma metilul anorganic în metilmercur CH_3Hg^+ , apoi în dimetilmercur $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ mai volatil, care trece în atmosferă. Metilmercurul rămâne în hidrosferă, de unde intră în lanțul alimentar, fiind absorbit de diverși consumatori ai sistemului ecologic. Prin moartea plantelor și animalelor, metilmercurul este reîncorporat sedimentelor și astfel ciclul său în natură se reia (Gârban et al., 1998).

Studiile de specialitate au demonstrat că mercurul sub formă de clorură de metilmercur produce tumori ale rinichiului la șoarecii de sex masculin. Analog s-au făcut studii experimentale și pe șobolani, când s-a arătat că la ingestia de compuși ai mercurului apar anumite aspecte de carcionogenitate (Boffetta et al., 1993).

De asemenea cercetătorii au urmărit și posibilele efecte neurotoxice ale mercurului metalic și al compușilor mercurului (Duhr et al., 1993; Foo et al., 1993).

Mercurul sub formă de vapori este ușor absorbit în plămâni, unde rămâne până la șapte ore, înainte de a fi oxidat de către oxigen și trece, sub formă ionică în sânge; se localizează, în cea mai mare parte, în rinichi, ficat și splină.

Concentrația medie în țesuturi uscate este de 0,5-2,5 mg / Kg, cu valori mai ridicate în: piele, unghii, păr, ficat, plămâni și mai ales în rinichi, unde concentrația medie este de 2,75 mg / Kg. În hematii concentrația Hg este dublă comparativ cu plasma, iar în urina umană este foarte variabilă: concentrația critică peste care Hg devine suspect ca toxic este de ordinul 0,1 – 0,2 μg / L.

Smațul (emailul) spre fața exterioară a dinților conține în medie 2,8 mg / Kg mercur, iar cel interior 2,3 mg / Kg. La persoanele cu expunere necunoscută, dar anormală la mercur, vârful părului conține 5,5 mg / Kg, unghiile de la mâini 7,3 mg / Kg și de la picioare 2,4 mg / Kg mercur; aceste cantități fiind mult crescute la indivizii cu expunere accidentală sau industrială. Concentrația de mercur de 230 – 280 ori mai mare în păr, comparativ cu sângele, poate fi utilizată la determinarea gradului de expunere la mercur (Țurcanu, 1978).

Boala Minamata este de fapt un hidrargism neprofesional cauzat de intoxicația alimentară cu mercur provenit din deșeurile industriale deversate în apele curgătoare și mare, care prin lanțul trofic determină acumulări de mercur în produsele marine (e.g.: pești) și acestea consumate de om duc la intoxicații.

Absorbția mercurului este dependentă de calea de preluare și forma chimică. Inhalat sub formă de vapori este absorbit aproape integral, în timp ce absorbția prin piele și pe cale digestivă sunt mult mai reduse.

Transferul în sânge al mercurului absorbit este dependent de curba sa de expunere și de forma sa chimică. Inhalat sub formă ionică, în sânge, este oxidat rapid și fixat pe radicalii tiol (-SH) ai proteinelor plasmatică; cantități mici neoxidate străbat bariera hematoencefalică, producând grave tulburări nervoase.

La om mercurul se acumulează în rinichi, care conțin în medie 2,75 mg / Kg, față de 0,05 – 0,3 mg / Kg în majoritatea țesuturilor, inclusiv în pulmon și ficat. Cantități reduse de mercur se acumulează și în glandele salivare, mucoasa digestivă și în placentă.

Mercurul metalic și derivații acestuia sunt oxidați în sânge și în țesuturi când se formează săruri mercurice. Acestea formează mai apoi compuși solubili cu proteinele și substanțe alcaline din sânge, precum și cu lichidul tisular (Țurcanu, 1978).

Sărurile alchil-mercurice și aril-mercurice circulă în concentrații de aproximativ 90 % în eritrocite de unde – datorită liposolubilității – se acumulează nemodificate în creier (15 %), în păr (de unde pot fi determinați) și pot străbate placenta – concentrându-se în sângele fătului cu aproximativ 20 % mai mult decât în sângele mamei.

Eliminarea mercurului are loc cu precădere pe cale renală (până la 10% din totalul mercurului care traversează rinichiul) și numai în cantități mici pe cale hepatică, dar se elimină și prin intestin, glande salivare, sudoripale, iar la femei și prin glanda mamară.

Toxicitatea ridicată a compușilor mercurului și acțiunea lor disimulată constituie o amenințare extrem de serioasă pentru fauna terestră și acvatică, precum și un pericol permanent pentru om.

Faptul că mercurul are o acțiune toxică majoră se explică prin caracterul liposolubil. Ionul mercuric (Hg^{2+}) se oxidează în ion mercuric (Hg^{2+}), formându-se sărurile mercurice reactive biologic cu radicalii tiol, din care rezultă mercaptide mercurice.

La om, metilmercurul este secretat în intestin sub forma complexului metilmercur-cistină, ușor răspândit prin sânge în organism. Mercurul, legat de proteine în membrana celulară, poate influența distribuția ionilor și potențialul electric, influențând negativ trecerea substanțelor nutritive prin membrane. În același timp se pot produce perturbații în funcția mitocondriilor și lizozomilor, dar și anomalii ale cromozomilor; poate leza măduva oaselor, fibrele nervoase, ficatul și rinichiul.

Toxicitatea metil- și dimetilmercurului este mult micșorată de către compuși ai seleniului, care reacționează direct cu dimetilmercurul și cu vitamina B₁₂ metilată, pentru a forma dimetilseleniura, volatilă, cu toxicitate net inferioară, care se elimină pe cale pulmonară. Intoxicațiile acute cu mercur sunt accidentale, ele producând iritarea sau chiar distrugerea țesuturilor. Intoxicațiile cronice, întâlnite la persoanele expuse timp îndelungat la vapori de mercur, sunt însoțite de inflamații ale gingiilor, tremurături, un dezechilibru neuropsihic, ale căror simptome duc până la schimbarea personalității indivizilor.

Consumul alimentelor infestate cu mercur (în special al peștilor), constituie principala sursă de contaminare a omului cu mercur.

Conform recomandărilor Comitetului mixt de experți în aditivi alimentari ai FAO / WHO (citate de Anke et al., 1993a), dozele săptămânale tolerabile temporar sunt de 0,3 mg mercur total de persoană, dintre care mai puțin de 0,2 mg sub formă de metilmercur.

Plumbul. Principalele surse de răspândire în mediul înconjurător s-au deplasat în zilele noastre de la obținerea și aplicațiile lui diverse, la gazele de eșapament a motoarelor care folosesc carburanți cu cifra octanică ridicată. Poluarea produsă crește cu numărul autovehiculelor utilizate, distanța de la șoselele cu trafic intens, direcția vântului, precipitații, altitudine, anotimpuri – având un maxim iarna. O concentrație de 0,002 mg / m³, pe o perioadă de trei luni, prezintă un risc public.

Ținând seama de poluarea crescândă a mediului cu plumb, este dificil de stabilit nivelurile considerate ca normale în țesuturi. În condiții normale de mediu, concentrația plumbului în sânge la om este cuprinsă între 0,015-0,040 mg / 100 mL, cu o valoare medie de 0,025 mg / 100 mL. Concentrațiile de 0,05-0,08 mg / 100 mL sunt considerate toxice, la bovine 0,18±0,10 μg / mL, iar la porci 0,7±0,3 mg / Kg. Distribuția plumbului în țesuturi depinde de cantitate, formă chimică și de calea de administrare. Administrat pe cale orală este reținut în principal în rinichi, în ficat și în mai mică măsură în alte țesuturi. Plumbul este stocat sub formă de fosfat în cea mai mare parte în schelet: 77,4 % în intoxicație acută, 90 % în cea subacută și 98 % în intoxicație cronică, concentrația plumbului în oase fiind de 10-15 mg / Kg os degresat. La om concentrațiile tisulare ale plumbului, în mg / 100 g tetraetil de plumb

(TP), sunt de ordinul: 0,67 – 3,59 în oase; 0,04 – 0,28 în ficat; 0,02 – 0,16 în rinichi; 0,01 – 0,7 în splină; 0,04 în cord și 0,01 – 0,09 în creier (Țurcanu, 1978).

Distribuția și retenția plumbului în țesuturi este influențată de ionii de calciu, fier, fosfați, ioduri, carbonat acid de sodiu, vitamina D. Carența de fier favorizează retenția plumbului în țesuturi, iar un raport suplimentar de fier reduce riscul intoxicației cu plumb.

Absorbția plumbului este lentă și are loc pe cale gastro-intestinală (ca urmare a unei igiene deficitare) și respirator (ca urmare a inhalării pulberilor fine, a aerosolilor sau a compușilor volatili). Absorbția subcutanată sau intramusculară, este rar întâlnită și prezintă interes numai în cazurile alicelor de plumb sau a gloanțelor ajunse în țesut. Absorbția digestivă a plumbului ingerat este de 5 – 15 % la om, 10 % la bovine, cca. 1 % la ovine. Absorbția, în general, este superioară la organisme tinere, și poate crește la persoanele cu regim deficitar în calciu sau cu carență gravă.

Gradul de absorbție este influențat de solubilitatea sărurilor și compoziția hranei, un conținut ridicat în glucide, proteine, calciu, fier, fosfați și seleniu, inhibă absorbția. Carența de vitamină D reduce absorbția plumbului, iar cea de calciu o stimulează. Absorbția plumbului pe cale respiratorie este dependentă de dimensiunea particulelor.

Circulația plumbului în organism are loc sub formă coloidală de trifosfat bazic de plumb, legat de eritrocite. Depozitarea plumbului se face preponderent în oase sub formă netoxică, metabolismul său fiind asemănător cu al calciului. Depozitarea plumbului în trabeculele osoase, urmată de o eliminare lentă reprezintă un mecanism de inactivare prin sechestrarea sa într-un compartiment biologic cu sensibilitate scăzută față de acțiunea lui toxică. În cazul unei acidoze sau alcaloze plumbul este mobilizat rapid.

Eliminarea plumbului se face prin bilă, fecale și pe cale renală. Secundar plumbul se mai elimină și prin fanere (unghii, păr) sau prin laptele matern. Astfel, prin absorbție, plumbul ajunge în sânge și apoi în oase, în țesuturi moi, inclusiv în ficat, de unde este excretat prin bilă în intestinul subțire și apoi eliminat prin fecale.

Bilanțul normal al plumbului rezultă din aportul pe cale respiratorie și digestivă a unei medii de 0,33 mg plumb / 24 ore (cu variații de 0,05 – 2 mg), cantitate care este în totalitate eliminată în 24 ore. Corespunzător bilanțului normal al plumbului există o plumbemie normală de 10-40 $\mu\text{g} \%$ și o plumburie normală de 10-80 $\mu\text{g} / \text{L}$. Creșterea aportului peste aceste valori și peste capacitatea de eliminare a organismului duce la un bilanț pozitiv al plumbului cu acumulare în organism.

Toxicitatea plumbului trebuie privită prin prisma faptului că din datele cunoscute până acum se pare că plumbul nu ar prezenta nici o funcție esențială pentru plante, animale și microorganisme.

Toxicitatea cronică a plumbului, cunoscută sub denumirea de saturnism este caracterizată prin anemie, tulburări neurologice, creșterea de peste 5 ori a conținutului de plumb în sânge. Plumbul inhibă prin blocaj grupările tiolice ale unor sisteme enzimatice, în special, acelea care produc sinteza hemoglobinei (inhibiția hemoglobinosintetazei) și provoacă anemie hipocromă. Un alt efect toxic important al acestui element, este faptul că inactivează enzimele ca urmare a deplasării biometalelor componente ale metaloenzimelor sau enzimelor activate de către metale, datorită afinității lui mari față de liganzi cu grupări aminice, carboxilice, inclusiv ale aminoacizilor.

Excesul de plumb acționează direct asupra membranei eritrocitare urmată de fragilitatea hematiilor și hemoliză intravasculară precoce; acționează asupra cromozomilor și alterează materialul genetic (determinând la femei tinere sterilitate, avorturi, mortalitate fetală sau cu malformații congenitale); are acțiune nefro-toxică directă, lezând chiar mitocondriile din celulele tubilor renali și acțiune neurotoxică – acționând asupra sistemului nervos central și periferic și nu în ultimul rând acționează nociv asupra sistemului vascular.

Legătura plumbului cu constituenții subcelulari specifici, ai metalotioneinei și RNA hepatic la expunerea la plumb și concentrațiile plumbului tisular în organismul uman, într-un mediu în continuă industrializare și contaminare, nu este pe deplin elucidată.

Remanența arseniatului de plumb (pesticid stabil și insolubil) folosit în agricultură, determină ca mustul obținut din strugurii tratați cu acest pesticid, poate să conțină 10-20ppm plumb, dar vinul pierde aceste metale din soluție prin legarea cu proteinele și insolubilizarea ulterioară. Se apreciază că vinul are rareori conținut de plumb mai mare de 1ppm. Plumbul are proprietatea de a se lega cu resturile de tiol, ortofosfat și carbonil, conținute în liganzi ai macromoleculelor și în membranele biologice. De aceea se consideră că o creștere a conținutului proteic al rației de vitamine C și PP, de minerale: calciu, fier sau fosfați scade toxicitatea acestui metal.

2. METODE ANALITICE ȘI BIOANALITICE ÎN INVESTIGAREA METALELOR

2.1. Principii metodologice generale

Rolul bioelementelor în organismul uman a dus la necesitatea unei mai bune cunoașteri în ceea ce privește caracteristicile chimice și fizico-chimice pentru a putea explica implicațiile acestora în nutriție, biochimie, patobiochimie, fiziologie, fiziopatologie, etc. Trebuie de asemenea, să se aibă în vedere și cantumul de elemente cu potențial toxicogen din mediu ambiant și din alimente deoarece efectele intoxicării organismului cu acești compuși sunt tot mai mult studiate și interesează tot mai mult fiziopatologia și toxicologia.

Cunoașterea mai aprofundată a tuturor aspectelor chimice, precum și metodele de determinare calitativă și cantitativă a acestor elemente luate în studiu vin în sprijinul cercetătorilor din acest domeniu de larg interes.

Cerințele tehnologiei moderne impun ca substanțele chimice din alimentele procesate să fie supuse unor teste mai complexe care să stabilească compoziția cât mai exactă a acestora, precum proprietățile caracteristice. În acest sens se încearcă să se determine structura substanțelor, modul de legare a grupărilor din moleculă, eventual chiar și orientarea lor în spațiu sau uniformitatea repartizării diferiților componenți în probă. De asemenea, se urmărește variația acestora în timp și efectele asupra mediului înconjurător și asupra organismelor vii.

Cuvântul grecesc analysis (ανάλυσις) are semnificația – la modul general – de “rezolvarea oricărei probleme în sensul cel mai larg al cuvântului”. Odată cu evoluția științelor termenul a fost folosit pentru a indica o metodă de cercetare, conform căreia studiul unui obiect se realizează prin descompunere în părți, urmată de investigarea sistematică a fiecărui component în parte. Termenul exprimă succint și sugestiv preocupările pentru caracterizarea multilaterală a substanțelor ceea ce întradevăr constituie obiectul chimiei analitice.

Compoziția unei substanțe se poate stabili sub aspect calitativ și/sau cantitativ. Din punct de vedere calitativ, se urmărește identificarea naturii indivizilor chimici, atomii, ionii, moleculele componente – și presupune obiectul chimiei analitice calitative. Din punct de vedere cantitativ, se determină cantitatea relativă a componenților identificați – și presupune cunoaștințe de chimie analitică cantitativă.

În cursul unei analize sistematice a unei substanțe necunoscute, analiza calitativă precede în mod logic analiza cantitativă.

Utilizarea conceptului de “metode analitice și bioanalitice” este acceptat în chimie cu scopul de a demarca în special domeniul de aplicabilitate. În acest sens se pot exemplifica aplicabilitatea în chimia anorganică, chimia organică, tehnologie, respectiv în biochimie, chimia alimentară, chimia clinică, chimia farmaceutică și în general în relație cu materia vie.

În acest capitol urmează a fi prezentate caracteristicile structurale – la modul general – în relație cu activitatea biologică.

2.2. Caracteristici structurale ale metalelor în relație cu activitatea biologică

Bioelementele metalice sunt caracterizate ca având o structură electronică, cu particularități asupra stratului de valență, dar și o serie de alte proprietăți, fiind clasificată în metale de tip *s*, *p*, *d*, *f*.

Din punct de vedere al structurii, metalele de tip *s* și *p* reprezintă sistemele cele mai simple. Majoritatea speciilor ionice pe care aceste elemente le formează (M^+ , M^{2+} , M^{3+}) se caracterizează, din punct de vedere al structurii electronice, printr-un înveliș exterior de tip gaz rar și anume de doi electroni pentru elementele din perioada a doua, și cei 8 electroni pentru celelalte metale alcaline, alcalino-pământoase. Pentru elementele situate în grupele III A, IV A și V A, perioadele IV-VI, speciile ionice corespunzătoare stării de oxidare maxime se caracterizează printr-o configurație de 18 electroni pe stratul exterior.

Sub denumirea de metale tranziționale de tip *d* sunt cuprinse elemente cu caracter metalic, care din punct de vedere al structurii electronice se caracterizează prin prezența în atomii lor a nivelului *d* parțial ocupat (Brezeanu et al, 1990).

Elementele zinc, cadmiu, mercur, fluor sunt cuprinse în categoria metalelor tranziționale. În stare atomică aceste elemente se caracterizează prin existența orbitalilor *d* și *s* complet ocupați $[(n-1)s^2(n-1)p^6(n-1)d^{l^0}(n)s^2]$, iar în combinațiile lor rămân cu 18 electroni pe ultimul înveliș electronic $[(n-1)s^2(n-1)p^6(n-1)d^{l^0}]$.

Metalele tranziționale de tip *f* sunt grupate în două serii, fiecare continând două tipuri de elemente. Prima serie cuprinde elemente cunoscute sub denumirea de lantanoide, situate în perioada a șasea și caracterizate din punct de vedere al structurii electronice prin faptul că nivelul *4f* este în curs de completare (tranziționale *4f*). Cea de-a doua serie cuprinde elemente sub denumirea de actinoide, situate în perioada a șaptea și caracterizate prin faptul că nivelul *5f* este în curs de completare (tranziționale *5f*).

Știind posibilitățile multiple ale legării acestor metale cu alți compuși este necesar să se facă o cercetare complexă și să se analizeze cu atenție rezultatele.

În acest sens, se prezintă câteva informații privind interacțiunea DNA cu ionii metalici divalenți.

Progresele realizate în domeniul biologiei moleculare au adus un suport teoretic și practic în înțelegerea relației structură chimică-activitate biologică din cadrul macromoleculii de DNA, contribuind la explicarea unor aspecte referitoare la procesele normale, fiziologice și patologice.

În acest context investigările referitoare la interacțiunea dintre DNA și ionii metalici, se impune ca și domeniu de vârf al chimiei bioanorganice, datorită numeroaselor implicații biologice și medicale. Asupra acestui subiect se va reveni în Cap. 4.

2.3. Principalele metode de investigare a metalelor din produse biologice

Electrolitii, alături de alți metaboliți (glucidici, lipidici, protidici) prezintă un rol deosebit de important în funcționarea optimă a diverselor procese care au loc în organism, dar și de a menține integritatea morfofuncțională a organismului. Metabolismul "mineral" este reprezentat de elemente metalice sau nemetalice prezente în general sub formă ionică (cationi și anioni). Organismul uman este bine reprezentat de macroelemente cca. 80% din conținutul anorganic în organism (calciu, magneziu, sodiu, potasiu, fosfor, clor, sulf, etc.), dar și oligo- și microelemente (fier, cupru, iod, mangan, cobalt, zinc, molibden). Pe lângă

aceste minerale prezentate mai sus mai sunt prezenți și aluminiul, cromul, cadmiul, mercurul, plumbul – care sunt considerate elemente cu potențial toxicogen și ca atare sunt studiate din punct de vedere al acțiunii toxice asupra organismului.

Comparând metaboliții glucidici, lipidici și protidici cu elementele minerale putem afirma că acestea din urmă nu pot fi sintetizate sau degradate în organism. Ca atare, în condiții fiziologice normale, acestea se află în anumite concentrații în mediul intern – chiar dacă aportul exogen mineral variază deseori apreciabil. De asemenea, funcția de excreție a organismului joacă un rol deosebit în procesul de menținere constantă a concentrației electroliților în mediul intern. În domeniul nutrițional și al medicinei, dar și în alte domenii conexe acestora, cunoașterea valorilor normale sanguine ale principalilor electroliți sunt indispensabile, deoarece orice stare patologică a organismului este însoțită de modificări ale cantitativului electrolitic și a interrelațiilor electroliților cu metabolismul general.

Bioelectroliții sunt caracterizați de o activitate dinamică, definită prin mișcarea între mediul interstițial și cel celular. Este însă deosebit de importantă exprimarea acestora în unități fizico-chimice. Concentrația acestora se exprimă, în general, în mol / L sau în Eq / L. De asemenea, în studiul osmolarității se utilizează exprimarea în mOsM / L. În condiții fiziologice normale, presiunea osmotică a sângelui variază în limite destul de mici, fiind de 300-310mOsM/L.

Exprimarea electroliților sanguini se face procentual, iar valorile normale (în organismul uman) pentru câteva bioelemente sub formă ionică sunt: concentrația sanguină a potasiului ionic (K^+) 20mg %, iar în plasmă este 195mg %_o (masa atomică este 39); concentrația sanguină a calciului ionic (Ca^{2+}) este 10mg % iar în plasmă este de 100mg%_o (masa atomică este 40); concentrația plasmatică a sodiului ionic (Na^+) este 3250 mg%_o (masa atomică este 23); concentrația plasmatică a magneziului (Mg^{2+}) este 36 mg%_o (masa atomică este 24); concentrația clorului ionic (Cl^-) este 3620 mg%_o (masa atomică 35,5); concentrația ionilor de bicarbonat (HCO_3^-) este 27 mEq/l; concentrația ionilor de fosfat acid ($PO_4H_2^-$) este 31 mg%_o, iar concentrația ionilor sulfat (SO_4^{2-}) este 16 mg%_o. Prezentarea concentrației anionilor și cationilor poartă denumirea de ionogramă.

Determinarea cantitativă a unor cationi se poate face prin metode chimice – predilect volumetrică și prin metode fizico-chimice – metode optice (flamfotometria, spectrofotometria, ș.a.). Metoda de lucru aleasă are în vedere mai multe aspecte cum ar fi: precizia metodei, aparatura și reactivii necesari, durata analizei și nu în ultim rând natura probei analitice pentru care se face analiza respectivă (Liteanu, 1973; Kekedy, 1982; Colecția de Standarde pentru Industria cărnii, 1985; Colecție de Standarde de Ramură – Conserve și Semiconserve de Pește, 1991; Helrich, 1990; Dogaru și Dragoș, 1998; Dogaru et al., 2002).

Determinarea sodiului

Metoda flamfotometrică. Se bazează pe următorul principiu: soluția de analizat se pulverizează în mod automat cu ajutorul unui pulverizator și se introduce sub formă de aerosoli în flacăra unui arzător special (Brenner). Apa din soluția salină după ce ajunge în flacăra se evaporă, iar substanța solvatul trece în fază gazoasă, iar apoi moleculele pot disocia la rândul lor în atomi sau ioni. În flacăra flamfotometrului se produce o excitație și astfel apar așa numitele spectre de emisie, care după ce trec prin filtre optice de selecție, sunt focalizate pe o celulă fotoelectrică. Astfel ia naștere un “fotocurent” a cărui valoare se poate măsura cu un galvanometru, iar intensitatea fotocurentului format este direct proporțională cu concentrația ionilor de sodiu (Na^+) din lichidul biologic analizat (ser sanguin, lichid cefalo-rahidian, urină).

În cazul analizelor de alimente (carne și derivate) se utilizează frecvent determinarea conținutului de clorură de sodiu și mai puțin determinarea sodiului.

și indicator, ionii de calciu formează în mediul alcalin o colorație roz, iar absența ionilor de calciu este dată de apariția culori albastru-verde.

d) Metoda colorimetrică cu reactivul Arsenazo III. Calciul reacționează cu reactivul Arsenazo III în mediul acid și formează un complex de culoare albastru intens. Concentrația de calciu este proporțională cu intensitatea culorii obținute, care apoi este colorimetrată la $\lambda = 650\text{nm}$ (interval $\lambda = 640\text{-}660\text{nm}$), se citește extincția și prin calcul se determină cantumul de calciu din ser sau plasmă tratată cu heparină.

Această metodă a fost modificată astfel încât citirile la colorimetru să se facă la $\lambda = 600\text{nm}$ (pentru aparate automate, dar fără filtru pentru $\lambda = 650\text{nm}$). Principiul metodei este identic, iar temperatura la care se pot face determinările pentru prima metodă ($\lambda = 650\text{nm}$) este de $+25^\circ\text{C}$ și pentru cea de-a doua metodă ($\lambda = 600\text{nm}$) temperatura la care se pot face citirile de extincție este de $+25^\circ\text{C}$ sau $+37^\circ\text{C}$.

e) Metoda colorimetrică cu complexonul o-crezolftealină. Este o metodă care permite determinarea cantumului de calciu din lichide biologice (ser sau plasmă tratată cu heparină) fără a necesita o etapă de deproteinizare a probei. Este, de asemenea, o analiză colorimetrică, care are la bază formarea unui complex violet între calciu și complexonul o-crezolftealină, în mediul alcalin. Lungimea de undă pentru citirile extincției este $\lambda = 578\text{nm}$ (cu un interval de $\lambda = 550\text{-}590\text{nm}$), la temperatura de $+25^\circ\text{C}$.

Determinarea magneziului

a) Metoda colorimetrică. Principiul metodei are la bază reacția dintre ionii de magneziu și galben titan, un complex de culoare roșie. Pentru stabilirea culorii și pentru colorimetrare se adaugă alcool polivinilic sau gumă arabică (soluții macromoleculare). Pentru soluția obținută se măsoară extincția (la $\lambda = 560\text{nm}$ și folosind filtru S_{57}) prin determinări spectrofotometrice. Se folosește pentru determinări de magneziu din ser sanguin și urină.

b) Metoda Xylidylblue. Este o metodă ce presupune formarea unui complex ce poate fi apoi analizat fotometric. Magneziul prezent în serul sanguin (sau alte lichide biologice) formează un complex roșu cu o soluție alcoolică de Xylidylblue, care este de culoare albastră doar la $\text{pH} = 9\text{-}10$ și după adăugarea unei soluții tampon. Intensitatea culorii obținute este proporțională cu concentrația soluției de magneziu și se determină fotometric la $\lambda = 546\text{nm}$ sau 520nm și la temperatura de $+25^\circ\text{C}$.

Determinarea fierului

a) Metoda colorimetrică cu o-fenantrolina. A fost propusă de Comitetul Internațional de Standardizare în Hematologie (Munchen, 1970) și presupune o etapă primară de deproteinizare a serului pentru desfacerea legăturilor dintre fier și proteine. În final se formează un complex colorat între ionii de fier și o-fenantrolina sau bathofenantrolina. Pentru soluția obținută se măsoară extincția la $\lambda = 535\text{nm}$ pentru cazul în care se folosește o-fenantrolina și $\lambda = 510\text{nm}$ pentru cazul în care se folosește bathofenantrolina.

b) Metoda colorimetrică cu 2,2'-dipiridil. Este utilizată pentru determinări din carne și derivate. Fe^{3+} se reduce cu acid ascorbic la Fe^{2+} care formează cu 2,2'-dipiridil un complex roșu-roz. Intensitatea culorii complexului format se măsoară colorimetric. Sensibilitatea metodei este de $1 \mu\text{g} / \text{Kg Fe}$ (STAS 10542 / 3 – 77).

c) Metoda colorimetrică cu bathofenantrolină. Se lucrează la pH acid prin care fierul este eliberat din serul sanguin (din complexul format cu transferina) prin acțiunea unor surfactanți, după care este redus la Fe^{2+} . Acesta (ionul feros) reacționează cu

bathofenantrolina și formează un complex colorat care este apoi determinat fotometric la $\lambda = 546\text{nm}$ sau 535nm , la temperatura de $+25^\circ\text{C}$.

d) Metoda colorimetrică cu Ferrozine. Fierul din ser este eliberat din transferină de diverși surfactanți și este trecut într-un mediu acid. După ce a fost eliberat, fierul este redus la Fe^{2+} și acesta reacționează cu Ferrozina formând un complex de culoare roșie care este apoi determinat fotometric. Lungimea de undă la care se lucrează este de $\lambda = 578\text{nm}$ sau 560nm , la o temperatură de 37°C .

Determinarea capacității de legare a fierului total prin precipitare cu carbonat de magneziu se bazează pe faptul că se adaugă un exces de fier (ion feric) pentru a satura transferina. Fierul rămas necomplexat de transferină este absorbit de carbonatul de calciu (CaCO_3) care se adaugă. Ionii de fier legați în supernatant au fost denumiți cu un termen generic "capacitatea de legare a fierului total" (TIBC – Total Iron Binding Capacity) și valoarea se determină prin calcul. Prin această metodă se poate calcula capacitatea de legare a fierului total (TIBC), capacitatea de legare a fierului "nesaturat" (UIBC – Unsaturated Iron Binding Capacity) și sideremia sau transferina.

e) Metoda spectrofotometrică după mineralizare cu acizi tari (HCl sau HNO_3). Presupune cântărirea probei la balanță analitică, calcinarea acesteia în creuzet la temperaturi ridicate (după un program de temperatură bine stabilit) timp de cca 16 ore. Se reia apoi cenușa obținută cu acizi tari, după care se evaporă la sec pe baia de nisip. Se calcinează apoi proba reluată cu acid încă aproximativ 2 ore după care se face mineralizarea probei. Soluția astfel obținută este analizată spectrofotometric la $\lambda = 372,0\text{nm}$, când se determină concentrația de fier din proba analizată.

Determinarea cuprului

a) Metoda spectrofotometriei de absorbție atomică cu acid azotic. Se pretează pentru probe de ficat, rinichi, sânge, etc. Acestea trebuie eliberate de matricea organică și de culoare. În acest sens proba este supusă calcinării la temperaturi ridicate, după care se face mineralizarea acesteia cu acizi. Dar, cuprul, ca și fierul, zincul, calciul, magneziul, sodiul, potasiul, nichelul pot fi analizate în matrici biologice prin calcinarea probei pentru îndepărtarea matricei organice, dizolvarea cenușei în acid azotic și apoi aspirarea probei în spectrofotometrul de absorbție atomică Perkin-Elmer 303 sau echivalent al acestuia. Cuprul se determină prin metoda spectroscopiei de absorbție atomică; concomitent se pot determina arsenul, fierul, plumbul, thaliul, zincul etc., folosind standarde adecvate și metoda curbei etalon.

b) Metoda fotocolorimetrică cu 2,2'-dichinolil. Se utilizează în industria alimentară la dozarea cuprului din produse piscicole (STAS 1807 / 2 – 83) sau carne și derivate (STAS 10542 / 2 – 76). Această metodă presupune reducerea cuprului bivalent (Cu^{2+}) cu hidroxilamină la cupru monovalent (Cu^+). Astfel, cuprul monovalent format formează cu 2,2-dichinolil, în mediu tampon, dichinolatul de cupru de culoare roșie-vioacee care se extrage cu alcool izoamilic. Intensitatea culorii compusului format se măsoară la fotocolorimetru.

c) Metoda colorimetrică cu dietilditiocarbamat de sodiu. Se bazează pe reacția dintre cupru bivalent (Cu^{2+}) și dietilditiocarbamatul de sodiu și este aplicată a dozări de cupru din pește și conserve de pește (STAS 1807 / 2 – 83) și carne și derivate (STAS 10542 / 2 – 76). Se formează carbamatul de cupru de culoare galben-brună care se extrage cu tetraclorură de carbon. Intensitatea culorii soluției obținute se măsoară colorimetric și astfel se calculează concentrația cuprului din soluție.

d) Metoda volumetrică cu ferocianură de potasiu din forme pulverulente și aerosolizate de cupru. Acestea sunt reținute din aer în soluții absorbante sau pe dispozitive

filante. Cuprul și derivații săi din țesuturi și substraturi cu conținut organic necesită în prealabil eliberarea prin mineralizare, solubilizare și filtrare. Sensibilitatea este de 10μg/ml.

Determinarea manganului

a) Metoda colorimetrică cu azotat de argint. Constă în faptul că Mn^{2+} și Mn^{4+} în mediu acid și în prezența $AgNO_3$ (catalizator) se oxidează la Mn^{7+} de culoare violetă cu persulfat de potasiu și se determină colorimetric.

Manganul din compușii organici necesită eliberarea prin mineralizare sulfnitrică/perclorică. Dioxidul de plumb și acidul azotic concentrat adăugat soluției care conține mangan, la fierbere, virează în violet. Reacția este pozitivă în absența Cl^- , care reduce MnO_4^- . Ionul de clor se îndepărtează în prealabil cu $AgNO_3$. Apa de brom în mediul puternic alcalin (hipobromit de sodiu) și 2-3 picături de $CuSO_4$ soluție 10% folosit drept catalizator. Reacția este pozitivă dacă soluția devine violetă.

b) Metoda spectrofotometrică cu acid azotic. Presupune cântărirea probei care conține mangan la balanță analitică și calcinarea acesteia în creuzet la temperaturi ridicate (după un program de temperatură bine stabilit) timp de cca 16 ore. Se reia apoi cenușa obținută cu acizi tari (HNO_3), după care se evaporă la sec pe baia de nisip. Se calcinează apoi proba reluată cu acid încă aproximativ 2 ore după care se face mineralizarea probei. Soluția astfel obținută este analizată spectrofotometric la $\lambda = 279,5$ nm, când se determină concentrația de mangan din proba analizată.

Determinarea zincului

a) Metoda spectrofotometriei de absorbție atomică acid clorhidric. Principiul metodei rezidă în faptul că zincul este eliberat din matricea organică (țesuturi umane sau animale) prin mineralizare exodativă. Proba decolorată și filtrată este analizată prin spectroscopie de absorbție atomică, utilizând metoda curbei etalon. Soluția standard stoc – se realizează dizolvând Zn metalic (1g) în cca 10 ml soluție acid clorhidric 6 N și apoi diluând cu apă distilată la 1000 ml (1ml=1mg Zn). Soluția standard de lucru – se obține diluând cu apă distilată (1:1000= soluția standard de stoc (1ml=1μg Zn). Parametrii de lucru pentru determinarea AAS: $\lambda=213,8$ nm, flacără de acetilenă-aer, interval de concentrație (Zn) 0,5-5 μg/ml.

b) Metoda colorimetrică cu ditizonă în mediu de citrat de amoniu. Se pretează determinărilor cantitative de zinc din conserve alimentare. Principiul metodei se bazează pe reacția zincului bivalent (Zn^{2+}) cu ditizona în toluen cu formarea ditizonatului de zinc. Reacția are loc în mediu de citrat de amoniu, la pH 9, iar produsul de reacție – ditizonatul de zinc este un complex de culoare roșie-roz care se extrage în toluen. Elementele de interferență se complexează cu dietilditiocarbamat de sodiu. Intensitatea culorii ditizonatului de zinc se măsoară colorimetric după care se calculează quantumul de zinc din produsul alimentar luat în studiu (STAS 8830 – 89).

c) Metoda colorimetrică cu ditizonă în mediu de acetat-acid acetic. Se pretează determinărilor cantitative de zinc din pește și derivate sau carne și derivate. Principiul metodei se bazează pe reacția zincului bivalent (Zn^{2+}) cu ditizona în tetraclorură de carbon, în mediu de acetat-acid acetic, la pH = 5,5 – 5,8 un complex roșu – ditizonatul de zinc. Acesta se extrage în tetraclorură de carbon. Elementele interferente se blochează cu tiosulfat de sodiu. Intensitatea culorii ditizonatului de zinc se măsoară colorimetric. Sensibilitatea metodei este de 1 μg / Kg Zn (STAS 8830 – 89).

d) Metoda cu ferocianură de potasiu. Se pretează determinărilor din pulberi aerosolizate sunt reținute în soluții absorbante sau pe dispozitive filtrante. Compușii din produsele organice (țesuturi) necesită eliberarea prin mineralizare. Astfel, soluția de analizat se tratează cu ferocianură de potasiu 10%. Reacția este pozitivă la apariția unui precipitat alb de ferocianură de Zn, solubil în alcalii.

e) Metoda cu reactiv Montequi A. Este utilizată pentru determinări din pulberi aerosolizate care sunt reținute în soluții absorbante sau pe dispozitive filtrante. Diverșii compușii din produsele organice (țesuturi) necesită eliberarea preliminară prin mineralizare. Astfel, soluția de analizat se tratează cu Reactiv Montequi A (5g CuSO_4 se dizolvă în 100 ml apă și se adaugă 0,2 ml H_2SO_4 concentrat) 1 picătură și, după agitare, Reactiv Montequi B (8g HgCl_2 și 9g sulfocianură de amoniu în 100 ml apă) 2ml. Reacția este pozitivă când apare un precipitat de tetrasulfo-cianatomercuriat de Cu și Zn violet.

f) Metoda cu 8-hidroxiquinolină. Utilizată pentru determinări din pulberi aerosolizate reținute în soluții absorbante sau pe dispozitive filtrante. Inițial, compușii din produsele organice (țesuturi) necesită eliberarea prin mineralizare. Astfel, soluția de analizat se tratează cu 8-Hidroxiquinolină (soluție 1,5% în acid acetic). Reacția pozitivă este dată de un precipitat galben-verzui de oxinat de Zn.

Determinarea plumbului

Metoda colorimetrică cu ditizonă. Se folosește pentru determinări din produse piscicole (STAS 5955-86) și carne și derivate (STAS 5955-78). Determinarea cantitativă a plumbului se bazează pe reacția dintre plumb și ditizonă în mediu amoniacal, la pH = 10 – 11 cu formare de ditizonatul de plumb de culoare roșie, solubil în cloroform. Elementele interferente se blochează cu cianură de potasiu. Acest compus după extragere și purificare se dozează colorimetric la lungimea de undă de 520 nm. Sensibilitatea metodei este de 0,1 mg / Kg Pb.

Determinarea arsenului

Metoda spectrofotometrică cu molibdat. Se aplică în industria alimentară și anume la dozarea arsenului din pește și conserve de pește sau carne și derivate (STAS 7118-79). Metoda presupune reducerea arsenului din compușii de arsen cu clorură stanoasă la As^{3+} . Apoi în prezența hidrogenului în stare născândă trece în hidrogen arseniat (AsH_3), care se captează într-o soluție de iod prin oxidare la As^{5+} . Prin reacția acestuia cu molibdatul de amoniu și prin reducerea cu sulfat de hidrazină se formează albastru de molibden. Intensitatea culori obținute se măsoară spectrofotometric și apoi se determină cantitatea de arsen din probă.

Determinarea staniului

a) Metoda spectrofotometrică cu violet de pirocatechină. Presupune după extracția staniului în toluen extragerea staniului tetravalent (Sn^{4+}) din proba mineralizată cu toluen sub formă de tetraiodură de staniu. Această metodă se pretează determinărilor cantitative de staniu din conserve alimentare (pește și carne). Extracția se realizează în mediu de acid sulfuric 9n și iodură de potasiu, după care se face aducerea în soluție apoasă cu acid sulfuric 2n. Staniul tetravalent formează cu violetul de pirocatechină și gelatina, la pH 2,3 – 2,5 un compus de culoare albastră. Intensitatea culorii compusului albastru se măsoară spectrofotometric sau fotocolorimetric și astfel se determină cantitatea de staniu din produsul alimentar luat în studiu (STAS 7119-86).

b) Metoda fotocolorimetrică directă cu violet de pirocatechină. Se realizează prin dozarea staniului din produse alimentare conservate de pește și carne. Staniul tetravalent

(Sn^{4+}) din proba mineralizată formează cu violetul de pirocatechină, în prezența gelatinei și la pH 2,3 – 2,5 un compus colorat. Intensitatea culorii compusului colorat se măsoară fotocolorimetric la 620 nm și apoi se calculează cuantumul staniului din proba de analizat (STAS 7119-86).

c) Metoda fotocolorimetrică cu quercitină. Sn^{4+} din mineralizatul probei de analizat formează cu quercitina, în mediu acid, un compus galben, după blocarea elementelor interferente cu tiouree. Intensitatea culorii compusului se măsoară colorimetric. Sensibilitatea metodei este de 20 mg Sn / Kg produs (STAS 7119-77).

În general, metoda cea mai des utilizată de determinare cantitativă a diverselor metale din probe de carne (țesut muscular) și organe este spectrofotometria de absorbție atomică. Modul de lucru constă în calcinarea probei la temperatură ridicată, după care se face mineralizarea probei. Cenușa rezultată de la calcinare se umectează cu acid (azotic sau clorhidric) și se calcinează din nou până la culoarea albă (fără prezența unor puncte negre). Cenușa albă astfel obținută se spală cantitativ de pe creuzete cu soluție acidă și se trece în balon cotat, după care se aduce la semn cu apă distilată și deionizată. Se face apoi pregătirea soluției etalon pentru trasarea graficului de referință (etalon) și apoi se face citirea probelor cu lămpi și la lungimi de undă caracteristice fiecărui element metalic la spectrofotometrul de absorbție atomică (AAS).

2.4. Metode specifice de investigare a unor parametrii biochimici sanguini

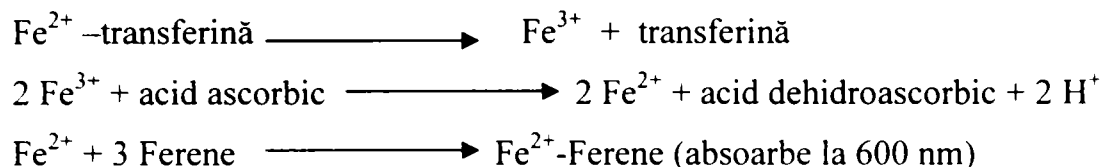
Dozarea metaboliților chimici sanguini cunoscută sub denumirea generică de „parametrii biochimici sanguini” prezintă importanță deosebită pentru interpretarea și evaluarea modificărilor care definesc statutul de homeostazie biochimică. Administrarea unor minerale (sub formă de cloruri – în cazul prezentei lucrării) prin gavaj determină perturbarea unor procese metabolice, iar evaluarea acestor modificări este posibilă și prin determinări de metaboliți sanguini.

În acest sens se descriu unele metode analitice de dozare a câtorva metaboliți de natură glucidică, lipidică, protidică și a unor electroliți din ser sanguin cu analizorul automat „Dimension”, produs de firma „Dupont”, care funcționează pe principiul unui spectrofotometru UV / VIS. În cele ce urmează se comentează sumar unele metode selective folosite în scopul determinării de parametrii biochimici cu ajutorul aparatului menționat anterior.

Determinarea fierului din ser sanguin

Metoda spectrofotometrică cu cromoforul Ferene. Analiza cantitativă a fierului în chimia clinică se pretează determinărilor in vitro din ser sanguin. Această metodă este o adaptare a procedurii propuse de Smith et al. (1984), care folosește un cromofor de tip Ferene. Fe^{2+} , formează un complex albastru cu 3-(2-piridil)-5,6-bis-2-(5-furil acid sulfonic)-1,2,4-triazina, care este o sare disodică numită Ferene. Mai apoi, s-a demonstrat că există o sensibilitate crescută a compusului Ferene în metoda de determinare a fierului sanguin (Higgins, 1981). Metoda de determinare cantitativă a fierului este o metodă directă care utilizează un surfactant pentru a preveni precipitarea proteinelor. Se utilizează o probă martor de ser pentru a corecta diferențele de turbiditate, iar potențialul de interferență al cuprului este minimizat de adăugarea tioureei.

Principiu metodei se bazează pe eliberarea fierului leagat de transferină (proteina serică) în prezența unui agent reducător, respectiv acidului ascorbic, în condiții acide (pH 4.5). Produsul de reacție rezultat, Fe^{2+} , formează în final compusul numit Ferene.

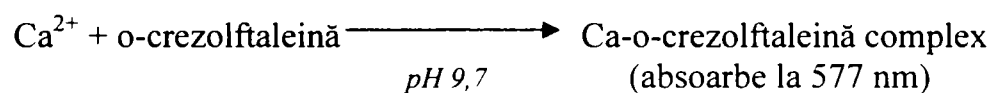


Absorbanța complexului format este proporțională cu concentrația complexului transferină-fier din serul sanguin și se măsoară la 600 nm sau 700 nm printr-o tehnică bicromatică.

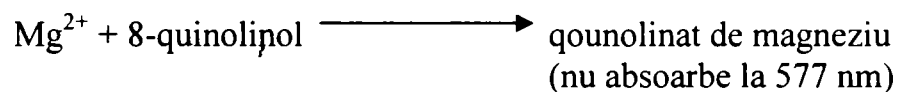
Determinarea calciului din ser sanguin

Dozarea spectrofotometrică cu 8-quinolinol și glicină. Se pretează pentru determinarea calciului din ser sanguin, plasmă și urină. Metoda modifică reacția dintre calciu și complexonul o-crezoltaleină raportată prima dată de către Andereg at al., (1954). Mai târziu, Stern și Lewis (1957) au adaptat această reacție la o tehnică colorimetrică de dozare a calciului. În cadrul acestor deretminări apar interferențe diverse. Interferențele magneziului au fost reduse prin utilizarea unui compus de tipul 8-quinolinol fără să apară precipitarea proteinelor serice (Connerty și Briggs, 1966). Metoda utilizată în analiza cantitativă a calciului folosește alături de 8-quinolinol pentru reducerea interferențelor megneziului, un sistem tampon de glicină care să controleze pH mediului de reacție.

Principiul metodei se bazează pe reacția dintre calciu și complexonul o-crezoltaleină cu formarea unui complex de culoare purpurie.



Cantitatea de complex format astfel este proporțională cu concentrația calciului și se măsoară folosind o tehnică bicromată endpoint la 577nm, 540 nm.

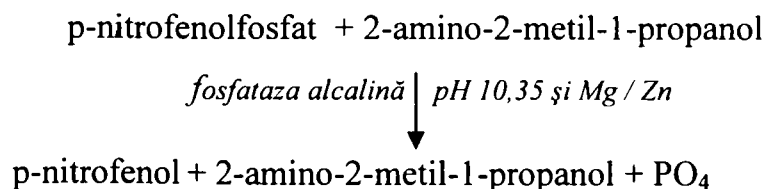


Ionii de magneziu, care de asemenea formează un complex colorat cu o-crezoltaleina, sunt îndepărtați din reacție prin complexare cu 8-quinolinol.

Determinarea fosfatazei alcaline din ser sanguin

Metoda spectrofotometrică cu p-nitrofenolfosfat și 2-amino-2-metil-1-propanol din serul sanguin. Permite analiza in vitro a activității fosfatazei alcaline din ser sanguin și plasmă. Aceasta se bazează pe procedura propusă de către Bowers și McComb (1966), revizuită mai apoi și este utilizată pentru determinarea tuturor izoenzimelor ALP din serul uman.

Principiu metodei constă în reacția de transfosforilare a p-nitrofenilfosfatului la p-nitrofenol, catalizată de fosfataza alcalină și în prezența unui sistem tampon de transfosforilare de tipul 2-amino-2-metil-1-propanol. Această reacție este intensificată prin utilizarea ionilor de magneziu și zinc.

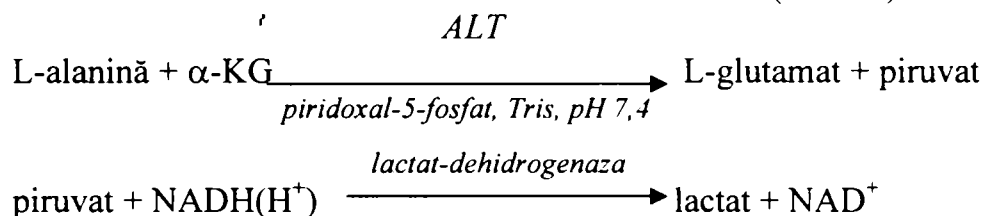


Modificarea absorbantei la 405 nm datorită formării p-nitrofenolului se măsoară folosind o tehnică bicromatică la 405 nm sau 510 nm.

Determinarea alanil-amino-transferazei din ser sanguin

Determinarea spectrofotometrică cu L-alanină și α -cetoglutarat din serul sanguin. Este o metodă a chimiei clinice de determinare in vitro și permite analiza activității alanil-amino-transferazei din ser sanguin și plasmă. Această metodă este o adaptare a procedurii propusă de Bergmeyer (1978) și se bazează pe principiul descris de către Wroblewski și LaDue (1956), dar conține piridoxal-5-fosfat ca activator și sistemul tampon a fost înlocuit cu un tampon fosfat, tris(hidroximetil)aminometan.

Principiu metodei constă în transaminarea L-alaninei și α -cetoglutaratului cu formare de L-glutamat și piruvat, reacții fiind catalizată de alanil-amino-transferaza (ALT). Piruvatul astfel format este redus la lactat în prezența lactat-dehidrogenazei cu oxidarea concomitentă a reducerii nicotinamid-adeninucleotidului (NADH).

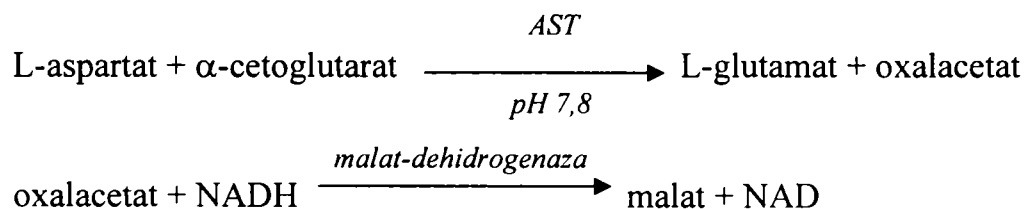


Modificarea absorbantei este direct proporțională cu activitatea ALT și este măsurată folosind o tehnică bicromată la 340 nm sau 700 nm.

Determinarea aspartat-amino-transferazei din ser sanguin

Metoda spectrofotometrică cu coenzima piridoxal-5-fosfat din ser sanguin. Este o metodă de determinare in vitro care permite determinări din ser sanguin și plasmă. Aceasta este o adaptare a procedurii propusă de Federația Internațională a Chimiei Clinice (International Federation of Clinical Chemistry – IFCC) prin Saris, 1978. Această tehnică folosește coenzima piridoxal-5-fosfatul pentru activarea apoenzimei și a lactat-dehidrogenazei pentru a elimina piruvatul care produce interferențe.

Principiu metodei presupune transaminarea L-aspartatului la α -cetoglutarat, cu formare de L-glutamat și oxalacetat, având catalizator aspartat-amino-transferaza (AST). Oxalacetatul format este redus apoi la malat de către malat-dehidrogenaza cu oxidarea concomitentă a nicotinamid-adeninucleotidului redus (NADH).



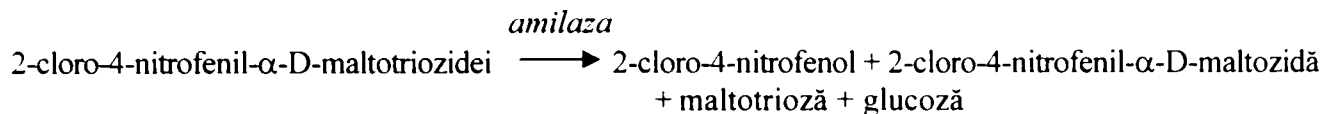
Modificarea absorbantei este direct proporțională cu timpul scurs până la conversia NADH la NAD catalizată de AST și se măsoară direct folosind o tehnică bicromată la 340 nm sau 700 nm.

, Determinarea amilazei din ser sanguin

Determinarea spectrofotometrică cu 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriozidei. Este o metodă de determinare care permite analiza activității amilazei din ser sanguin, plasmă și

urină. Metoda utilizează un substrat cromogenic, 2-cloro-4-nitrofenol legat de maltotrioză (Dichtt, 1984). Reacția directă a α -amilazei cu substratul formează 2-cloro-4-nitrofenol care este apoi determinat spectrofotometric. Determinările de amilază s-au folosit inițial pentru diagnosticarea și tratamentul pancreatitelor.

Principiul metodei se bazează pe cataliza reacției de hidroliză 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriozidei cu formarea de 2-cloro-4-nitrofenol, 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltozidă, maltotrioză și glucoză sub acțiunea α -amilazei.



După incubarea la 37°C timp de 70 secunde se măsoară absorbanta substanței 2-cloro-4-nitrofenol la 405nm sau 577nm.

Determinarea creatininei din ser sanguin

Metoda spectrofotometrică cu picrat. Permite analiza cantitativă a bilirubinei totale din ser sanguin, plasmă și urină. Metoda implică o modificare făcută la reacția Jaffe propusă de către Larsen (1972). Determinarea creatininei astfel, presupune o interferență mult mai mică cu non-creatinina și compușii Jaffe-pozitivi. Creatinina este în general considerată a fi substanța endogenă analizată cantitativ pentru evaluarea funcției rinichiului (Tietz, 1994).

Principiu metodei se bazează pe reacția dintre picrat și creatinina cu formarea unui cromofor roșu în prezența unei baze tari (cum ar fi NaOH).

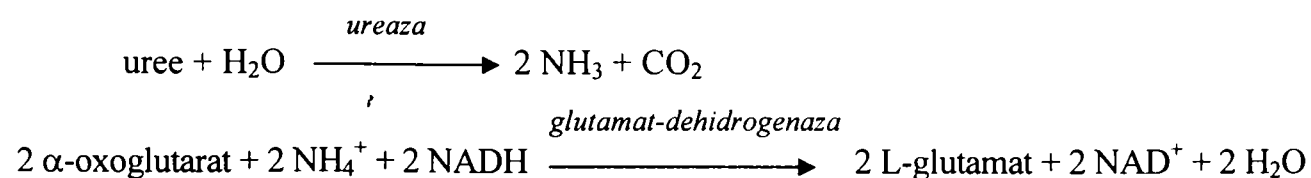


Rata de creștere a absorbantei la 510 nm se datorează formării acestui cromofor care este direct proporțional cu concentrația creatininei din probă. Acesta se măsoară folosind o tehnică bicromatică la 510 nm sau 600 nm. Bilirubina este oxidată de către ferocianura de potasiu pentru a preveni reacțiile de interferență.

Determinarea azotului ureic din ser sanguin

Metoda spectrofotometrică prin hidroliză. Se aplică pentru efectuarea de determinări din ser sanguin, plasmă și urină. Urea este sintetizată în organism la nivelul ficatului din amoniac care apare în organism în urma proceselor de deaminare a aminoacizilor. Acest proces de biosinteză a ureei este principala cale de excreție a azotului aflat în exces în organism. Determinările analitice de uree sunt utilizate în scop de diagnostic al bolilor metabolice și mai frecvent a bolilor renale. Dozarea ureei este de cele mai multe ori asociată cu determinarea creatininei din ser sanguin.

Principiul metodei constă în hidrolizarea ureei în prezența apei și a ureazei în urma căreia se formează amoniac și dioxid de carbon. În altă reacție amoniacul reacționează cu α -oxoglutarat și NADH în prezența glutamat-dehidrogenazei și produșii de reacție obținuți sunt glutamat și NAD^+ (Talke and Schubert, 1965).

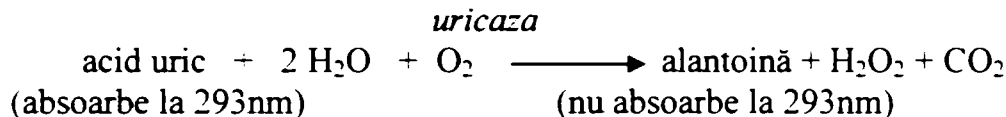


Modificarea absorbantei la 340 nm are loc datorită dispariției NADH-ului care este direct proporțională cu concentrația azotului ureic din proba de analiză și se măsoară folosind o tehnică cunoscută în literatura de specialitate ca "biochromatic rate technique" la 340nm și 383 nm.

Determinarea acidului uric din ser sanguin

Metoda spectrofotometrică cu formarea de alantoină. Permite determinări din ser sanguin, plasmă și urină. Această metodă este adaptată după metoda uricazei propusă inițial de către Bulger și Johns (1941), dar modificată apoi de către Kalckan (1947).

Principiul metodei constă în trecerea acidului uric, care absoarbe la $\lambda = 293\text{nm}$, în alantoină, care nu absoarbe la 293nm. Reacția decurge astfel:

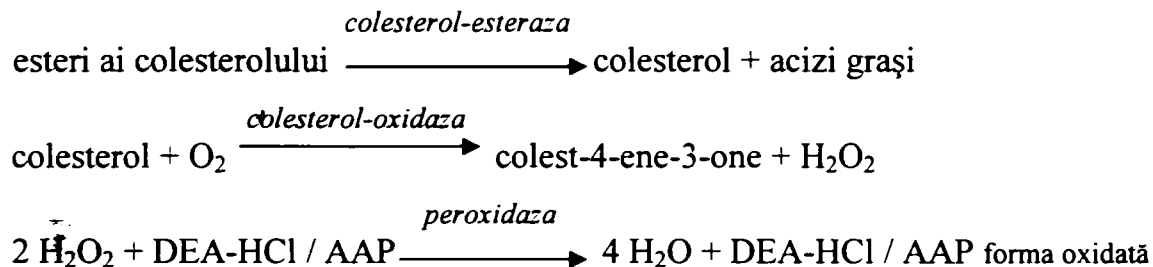


Modificarea absorbantei la 293nm datorită dispariției acidului uric este direct proporțională cu concentrația acidului uric din probă.

Determinarea colesterolului din ser sanguin

Metoda spectrofotometrică prin hidroliză. Este utilizată ca metodă in vitro care permite analiza cantitativă a colesterolului total din ser sanguin și plasmă. Principiul metodei se bazează pe descrierile făcute de Stadtman (1957) care au fost ulterior au fost modificate.

Principiul metodei se bazează pe hidroliza esterilor colesterolului cu formarea colesterolului liber care este apoi oxidat, reacție catalizată de colesterol-esteraza. Procesul de oxidare a colesterolului este catalizat de către colesterol-oxidaza cu formare de colest-4-ene-3-one și peroxid. În prezența peroxidazei izolate din hrean, peroxidul astfel format este utilizat pentru oxidarea N,N-dietilanilinei-HCl / 4-aminoantipiridine (DEA-HCl / AAP) cu producerea unui cromofor care este absorbit la 540 nm.

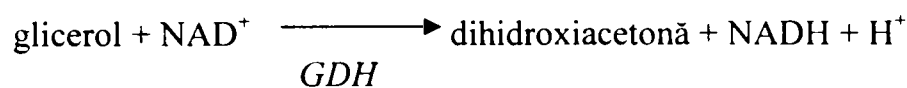
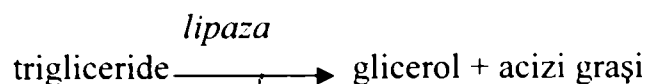


Absorbanta datorată oxidării DEA-HCl / AAP este direct proporțională cu concentrația colesterolului total și se măsoară la 540nm, 452nm sau 700nm. concentrația acidului uric din probă.

Determinarea trigliceridelor din ser sanguin

Metoda spectrofotometrică culipază. Se utilizează pentru determinări de trigliceride din ser sanguin și plasmă. Metoda este enzimatică și se referă la fluctuațiile de concentrații relative ale mono-, di- și trigliceridelor, dar și a glicerolului liber care apar în probele de ser sanguin (Hagen și Hagen, 1962; Rautela et al., 1974).

Principiul metodei se bazează pe preincubarea probei cu lipază care convertește trigliceridele în glicerol, liber și acizi grași. Glicerolul eliberat se determină enzimatic folosind glicerol-dehidrogenaza (GDH) și NAD.

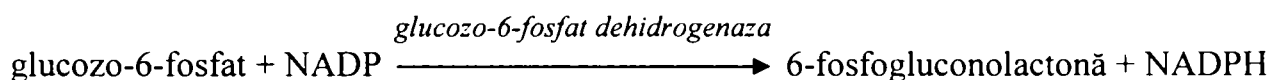
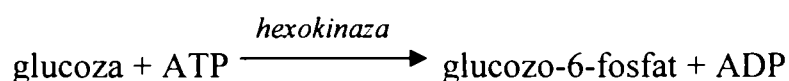


Modificarea absorbanței la 340nm se datorește formării de NADH este direct proporțională cu cantitatea totală de glicerol și precursorii acestuia din probă.

Determinarea glucozei din ser sanguin

Metoda spectrofotometrică cu adenozi-5'-trifosfat. Aceasta permite analiza din ser sanguin, plasmă, urină și fluidul cerebrospinal. Metoda este adaptată la metoda de determinare a hexokinaza-glucozo-6-fosfat dehidrogenaza (Kunst et al., 1983), fiind mai specifică decât alte metode generale de reducere enzimatică.

Principiu metodei are la bază reacția de fosforilare a glucozei de către adenzin-5'-trifosfat la glucozo-6-fosfat sub acțiunea catalitică a hexokinazei. Glucozo-6-fosfatul este oxidat apoi la 6-fosfo-gluconolactonă de către glucozo-6-fosfat dehidrogenaza cu reducerea simultană și a nicotinamid-adenin dinucleotid fosfatului (NADP).

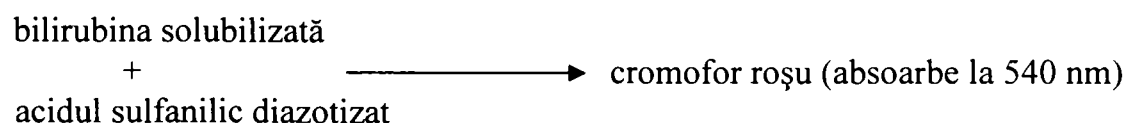


Astfel, un mol de NADP este redus la un mol de NADPH pentru fiecare mol de glucoză prezentă. Absorbanța este determinată datorită prezenței NADPH (deci unei anumite concentrații de glucoză) folosind o tehnică endpoint bicromată la 340 – 383 nm.

Determinarea bilirubinei totale din ser sanguin

Metoda spectrofotometrică cu acid sulfanilic diazotizat. Este utilizată la analiza cantitativă a bilirubinei totale din ser sanguin și plasmă. Aceasta este o adaptare a metodei Doumas utilizată ca referință. Utilizarea unui amestec de cafeină / benzoat la solubilizarea proteinelor legate prin conjugare de bilirubină a fost prima dată raportată de către Enriques și Silvo (1926) – care modifică defapt metoda propusă de către Jendrassik și Grof (1938).

Principiul metodei presupune formarea acidului sulfanilic diazotizat prin combinarea azotitului de sodiu și a acidului sulfanilic la un pH acid. Bilirubina (neconjugată) din probă este solubilizată prin diluare într-un amestec de cafeină / benzoat / acetat / EDTA. După adăugarea la acidul sulfanilic, bilirubina solubilizată (inclusiv bilirubina conjugată – mono- și diglucoronidele), precum și forma delta (biliprotein-bilirubină legată covalent de albumină) sunt convertite la diazo-bilirubină.



Acest compus diazo-bilirubina – este un cromofor de culoare roșie care reprezintă bilirubina totală și care absoarbe la 540 nm, măsurându-se folosind o tehnică endpoint bicromată.

2.5. Calculul rezultatelor

Rezultatele obținute în urma unor măsurători sau chiar valorile măsurătorilor trebuie să fie redate astfel încât să se obțină date certe de înaltă acuratețe și precizie. În acest sens se impune definirea unor termeni utilizați în calcularea rezultatelor analitice, metode de eliminare a unor date incerte (sau aberante), precum și modul de evaluare statistică a rezultatelor.

2.5.1. Definirea unor termeni utilizați în calcularea rezultatelor

Exactitatea – este un criteriu de măsură a abaterii valorii măsurate de la valoarea adevărată. Acest lucru presupune cunoașterea valorii exacte sau adevărate – ceea ce nu este întotdeauna posibil deoarece implică posedarea unui etalon studiat pentru comparație.

Precizia – este de asemenea un criteriu de măsurare, dar este utilizat pentru reproductibilitatea măsurătorii. Astfel, dacă există diferențe mari între măsurătorile repetate atunci precizia este mică. Deci o precizie apreciată bună nu înseamnă și că măsurătoarea este exactă deoarece este posibil să se facă mereu aceeași greșală.

Incertitudinea – este o expresie a extinderii unei erori într-o măsurătoare și se determină statistic sau prin propagarea erorilor estimate. O “valoare adevărată” a unei mărimi măsurate experimental nu este cunoscută niciodată. Astfel, valoarea raportată care este adeseori media mai multor măsurători, este considerată “cea mai bună valoare”. Deci dacă se reportează această valoare “cea mai bună”, este foarte util să se estimeze erorile exprimate ca incertitudine prin semnul \pm și astfel se dau limitele în care se presupune că se află valoarea adevărată.

Cifrele semnificative – reprezintă numărul de cifre necesar pentru a exprima o măsurătoare conformă cu precizia cu care este făcută. Dacă cifrei respective i se atribuie un anumit grad de siguranță, aceasta este o cifră semnificativă. Cifra “zero” poate fi o cifră semnificativă sau poate fi folosită pentru a localiza virgula zecimală. Dar în general, datele sunt astfel prezentate încât numai ultima cifră este nesigură.

O eroare este prin definiție *diferența dintre valoarea măsurată și valoarea adevărată sau incertitudinea estimată în executarea experienței*, exprimată în termeni de mărimi statistice. Diferența dintre două valori măsurate nu este definită prin eroare ci prin *discrepanță*.

Erorile întâmplătoare – sunt întâlnite când o măsurătoare este repetată și valorile rezultate nu corespund în mod exact. Aceste erori sunt experimentale sau accidentale și include erori de judecată și erori rezultate din condiții experimentale sau din aplicarea unui procedeu impropriu pentru măsurare.

Erorile sistematice – sunt erorile care apar în cazul în care toate valorile individuale au o eroare de aceeași mărime și sunt datorate procedurii aplicat sau sunt rezultatul unor erori de calibrare a instrumentului, al erorilor personale cauzate de obiceiuri, al condițiilor experimentale care se pot schimba și datorită imperfecțiunilor tehnice.

Erorile nepremise – sunt erorile care pot fi evitate și sunt rezultatul unor citiri greșite la diverse aparate (e.g.: balanță analitică), unor calcule incorecte sau a unor condiții experimentale necorespunzătoare.

Media sau media aritmetică – este valoarea numerică obținută prin împărțirea sumei valorilor unei serii de măsurători identice, la numărul rezultatelor individuale din serie.

$$m = \frac{\sum M_m}{n} \quad (1)$$

unde: M – măsurătoarea individuală;
 n – numărul total de măsurători.

Mediana – este valoarea față de care toate celelalte valori sunt distribuite în mod egal. Astfel, jumătate din valori sunt mai mari, iar cealaltă jumătate din valori sunt mai mici decât valoarea mediană.

Abaterea medie – este media abaterilor de la media aritmetică, fără a se ține seama de semn. Aceasta se calculează cu relația:

$$\bar{d} = \frac{\sum |M_n - m|}{n} \quad (2)$$

unde: \bar{d} - abaterea medie;
 $|M_n - m|$ - valoarea absolută a abaterii numărului M_n față de media aritmetică.

Abaterea standard (notată cu s sau într-o formă statistică mai precisă notată cu σ) – este obținută prin calcul pornindu-se de la abaterea aritmetică cu ajutorul relației:

$$s = \left[\frac{1}{n-1} \sum (M_n - m)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

sau

$$\sigma = \left[\frac{1}{n} \sum (M_n - m)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

unde: s și σ - sunt abateri standard;
 n – număr de măsurători;
 M_n – valoarea măsurată sau determinată.

În calcularea rezultatelor diverselor determinări analitice în care avem un anumit număr de măsurători (mai mare de trei) se impune și verificarea acestora din punct de vedere al certitudinii. Astfel, se încearcă stabilirea unor criterii după care să se poată afirma care dintre rezultatele măsurătorilor efectuate rămâne pentru calculul statistic ulterior. Variabilitatea rezultatelor poate să fie foarte mare și diferențele dintre măsurători semnificative. În acest caz, pentru a limita oarecum unele valori eronate (sau aberante) se impune găsirea unor metode analitice de calcul pentru a obține în final date de acuratețe.

2.5.2. Eliminarea datelor eronate

Se presupune că cu cât numărul de măsurători sau determinări pentru o probă dată este mai mare cu atât crește certitudinea că media acestor numere corespunde rezultatului adevărat. Deci, conform acestei teorii este de preferat să avem cât mai multe determinări sau măsurători pentru a obține un rezultat mai apropiat de cel adevărat.

Pentru a putea stabili care dintre măsurătorile efectuate trebuie să fie acceptate și care dintre măsurători vor trebui respinse trebuie să se țină seama de gradul de exactitate cerut de analiza respectivă. Astfel se au în vedere următorii termeni implicați în acest fapt:

Abaterea medie sau deviația medie. Se calculează abaterea medie a unei serii de determinări și datele se vor testa astfel: dacă o măsurătoare deviază de la medie mai mult decât $4\bar{d}$, aceasta poate fi exclusă din media originală, fapt valabil pentru o serie de măsurători sau determinări mai mare de trei.

Abaterea standard sau deviația standard. Dacă se fac mai multe determinări pentru o singură probă, se va vedea că rezultatele se vor apropia de o curbă de distribuție normală, în care frecvența de răspândire a măsurătorilor este în funcție de valoarea măsurătorii. Astfel, conform curbei de distribuție, o măsurătoare se înscrie în domeniul $\pm 1\sigma$ față de medie cu o probabilitate de 68,26%, în domeniul $\pm 2\sigma$ cu o probabilitate de 95,46%, iar în domeniul $\pm 3\sigma$ cu o probabilitate de 99,7%. În mod curent atunci când se utilizează abaterea standard drept criteriu pentru respingerea unei măsurători, se folosește 3σ . Dacă valoarea unei măsurători oarecare se află în afara acestui domeniu $\pm 3\sigma$, aceasta poate fi respinsă.

Testul Q sau criteriul coeficientului de respicție. Acest test se pretează la respingerea unei măsurători sau determinări când numărul total de determinări este de 3 până la 10 măsurători și poate fi aplicat la orice nivel de certitudine, dar în mod curent se folosește certitudinea de 90%. Acest lucru se explică prin faptul că dacă în urma aplicării testului se indică respingerea unei măsurători, aceasta poate fi eliminată cu o certitudine de 90%.

Datele respinse sunt date incerte (rezultate aberante) care nu se încadrează în valorile testului Q pentru un anumit număr de măsurători. Astfel, pentru un număr de trei măsurători valoarea testului Q pentru eliminarea datelor incerte cu o certitudine de 90% ($Q_{90\%}$) este 0,941. De asemenea, pentru cinci măsurători valoarea $Q_{90\%}$ este de 0,642, iar pentru 10 măsurători $Q_{90\%}$ este de 0,412 (Julean și Rotărescu, 1997).

Pentru a putea aplica acest test valorile măsurate se așează în ordine crescătoare. Se calculează apoi domeniul ($M_n - M_1$) și rapoartele Q pentru valorile superioare și inferioare:

$$Q_1 = \frac{M_2 - M_1}{M_n - M_1} \quad (5)$$

și

$$Q_2 = \frac{M_n - M_{n-1}}{M_n - M_1} \quad (6)$$

unde: Q_n – rapoarte necesare pentru aplicarea testului Q
 M_n – măsurătorile efectuate;
 n – numărul de măsurători efectuate.

Deoarece valorile care pot fi eliminate sunt M_1 sau M_n , testul Q se va aplica doar pentru aceste două valori. Rapoartele Q_1 și Q_2 se obțin prin împărțirea valorilor vecine din domeniu, la diferența dintre M_n și M_1 .

Distribuția t. Dacă pentru o anumită probă s-au făcut suficiente măsurători sau determinări se va obține o anumită distribuție. Dar, deoarece pentru majoritatea determinărilor, nu este posibilă executarea unui număr mare de măsurători, rezultatul provine din media calculată, care poate fi diferită de media distribuției. Astfel, distribuția t prevede limitele în care o medie va corespunde cu media distribuției.

În consecință, pentru a evalua limitele de certitudine se determină deviația standard (DS) a măsurătorilor și se obține o valoare a lui t din tabele, la un nivel dat de certitudine sau probabilitate. Valoarea tabelată a lui t este redată pentru nivele de certitudine de 80%, 90%, 95% și 99%. Aceste nivele de certitudine sau probabilitate sunt redată pentru mai multe măsurători (determinări analitice). În acest sens se exemplifică cazul în care avem un număr de trei măsurători, valoarea lui t la un nivel de certitudine 80% este 1,89; pentru un nivel de certitudine de 90% valoarea lui t este 2,92, iar pentru 99% certitudine valoarea t este 9,92%. Un alt exemplu ar fi cazul în care avem 10 măsurători analitice și valoarea t pentru 80% certitudine ar fi 1,38; pentru 90% certitudine valoarea t ar fi 1,83; iar pentru 99% certitudine valoarea t ar fi 3,25.

Limitele pentru un anumit nivel de certitudine sunt apoi calculate cu următoarea relație:

$$media \pm \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} \quad (7)$$

unde: t – se obține din tabel;
 s – deviația standard;
 n – număr de determinări sau măsurători efectuate pentru o probă dată.

Astfel, în concluzie, pentru eliminarea rezultatelor incerte finale trebuie avută în vedere posibilitatea erorilor sistematice și nepermise. Toate datele care includ erori nepermise trebuie din start eliminate. Datele rămase (în număr mai mare de 3) pot fi evaluate prin teste de deviație medie sau deviație standard și/sau prin testul Q. În cazurile în care există puține date determinate este preferabil să se ajungă la incertitudini prin evaluarea erorilor procedului în cadrul măsurătorilor – tehnică ce poartă denumirea de propagarea erorilor.

2.5.3. Evaluarea statistică a rezultatelor

Datele analitice obținute au fost supuse calculelor statistice, determinându-se în fiecare caz media (\bar{X}) și deviația standard (DS). Determinarea mediei \bar{X} s-a făcut conform relației:

$$X = \frac{\sum x}{n} \quad (8)$$

unde: x – valori experimentale individuale;
 n – numărul de probe;
 Pentru a se determina deviația standard (DS):

$$DS = \sqrt{\frac{\sum (x - X)^2}{n - 1}} \quad (9)$$

Pe baza datelor analitice obținute în cadrul acestei lucrări, s-a stabilit media (\bar{X}) și deviația standard (DS) pentru fiecare serie de probe.

De asemenea, probabilitatea (notată "p"), s-a calculat cu ajutorul programului Microsoft Excel.

2.6. Spectroscopia de absorbție atomică – caracteristici experimentale și aplicații

2.6.1. Privire generală

Spectrofotometria de absorbție atomică constituie o aplicație a chimiei analitice. Deși metoda este privită ca o realizare relativ recentă, fenomenele care stau la baza ei au fost observate de multă vreme.

Absorbția atomică a fost semnalată încă din 1802 prin liniile întunecate (liniile D) din spectrul soarelui. Aceste linii au fost atribuite de Kirchhoff și Bunsen absorbției radiațiilor din spectrul continuu, generat de suprafața soarelui, de către atomii liberi existenți în coroana solară.

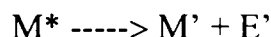
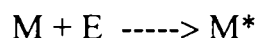
Kirchhoff a demonstrat că liniile D ocupă în spectru același loc ca și liniile emise de sodiu; și că o flacără care conține atomi de sodiu va absorbi liniile galbene generate de o sursă mai intensă.

Până în 1955 absorbția atomică nu a cunoscut nici o aplicație analitică. După această dată numărul lucrărilor relevând aspecte teoretice și practice ale absorbției atomice a crescut rapid. Au fost construite și se află în uz mii de aparate de absorbție atomică. În cele mai diferite laboratoare (alimentare, medicale, agricole și metalurgice).

Spectroscopia de absorbție atomică este o metodă de determinare a concentrației într-un element dintr-o probă, măsurând absorbția unei radiații electromagnetice de o anumită lungime de undă (frecvență), la trecerea printr-un mediu care conține, sub formă de vapori, uniform distribuiți, atomi liberi ai probei.

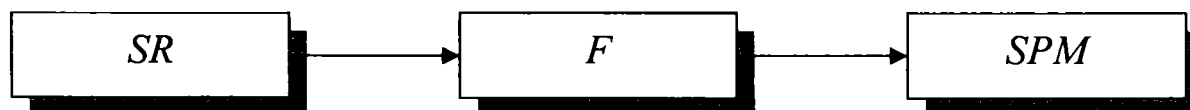
Modul de interacțiune al atomilor liberi cu diferite forme de energie, permite definirea celor trei metode de bază ale spectrometriei atomice: emisia, absorbția și fluorescența.

Această interacțiune poate fi ilustrată prin relațiile:



Să considerăm un atom liber M care, printr-un mecanism oarecare primește o cantitate de energie E suficientă pentru a trece într-o stare excitată, M^* . Atomul revine din starea excitată la o stare cu energie mai scăzută M' , punând în libertate cantitatea de energie E' . În cazul fenomenului de absorbție atomică E reprezintă o radiație termică, iar E' o energie de altă natură (electromagnetică, luminoasă).

În principiu, metoda spectrometrică de absorbție atomică poate fi mai ușor înțeleasă urmărind figura schematică 2-1.



- unde: SR - sursă de radiații
F - cuvă cu atomi în stare gazoasă (flacără)
SPM - spectrometru
- intensitatea fluxului radiant
 - intensitatea fluxului radiant transmis

Fig. 2-1. Schema spectrometriei de absorbție atomică

Proba se pulverizează într-o flacără, unde în urma evaporării substanței și apoi a disocierii termice a moleculelor, se produc atomi liberi. Flacăra devine astfel un spațiu delimitat, în care sunt conținuți atomi liberi, sau făcând o analogie cu spectrofotometria soluțiilor, o cuvă cu atomi liberi.

Atomii în stare fundamentală pot absorbi radiații specifice emise de către o sursă spectrală. Gradul de diminuare a puterii radiante a fluxului luminos după trecerea prin flacăra, măsurat tot de spectrometru, ne dă indicații cantitative asupra speciei M. Aceasta este metoda absorbției atomice.

Energia absorbită sau emisă în procesul sus amintit, nu poate avea nici o valoare, ci doar aceea care corespunde unei diferențe dintre două nivele de energie bine definite. O populație de atomi poate ocupa mai multe asemenea nivele, cel mai scăzut dintre acestea fiind denumit “nivel fundamental”, iar celelalte “nivele excitate”.

Vor fi emise sau absorbite numai acele radiații electromagnetice a căror frecvență satisface relația:

$$h\nu = \Delta E = E_q - E_p \quad (10)$$

unde: h – constanta lui Planck ($6,624 \cdot 10^{-27}$ erg·s)

E_q – nivelul inițial

E_p – nivelul final

Δ - diferența dintre două nivele energetice

O anumită frecvență emisă sau absorbită de o populație de atomi, ca urmare a tranziției dintre două nivele energetice, este denumită linie spectrală. Liniile emise sau absorbite de atomi formează un spectru atomic care este caracteristic fiecărui tip de atomi. Disponerea nivelelor de energie ale atomilor diferă de la atom la atom, ceea ce face ca și liniile emise în urma tranzițiilor să fie diferite. Mai mult, probabilitatea ca două linii spectrale să coincidă este extrem de mică.

În spectroscopia de absorbție, dintre tranzițiile spectrale posibile se utilizează cel mai frecvent acelea care corespund liniilor de rezonanță. Aceste linii apar în urma tranziției de pe nivelul fundamental la unul din nivelele excitate apropiate.

De interes în absorbția atomică este numai absorbția fotonilor, respectiv trecerea de la nivelul fundamental la cel excitat. Liniile apărute prin alte mecanisme decât cel de rezonanță, au o intensitate redusă și deocamdată ele nu prezintă prea mult interes din punct de vedere analitic.

2.6.2. Emisia și absorbția atomică

Sub aspect istoric primele cercetări și primele observații spectrale datează încă din secolul XVIII când Newton – cu ajutorul unei prisme – a reușit să descompună lumina albă în componentele colorate ale acesteia. Ulterior, în secolul următor au avut loc descoperiri ale liniilor întunecate din spectrul soarelui și s-a încercat explicarea originii acestor linii precum și stabilirea legăturii dintre natura radiațiilor emise și suportul material al acestora, iar mai apoi s-au realizat primele încercări de determinări cantitative.

Spre sfârșitul secolului XIX era cunoscut faptul că atomii liberi au un spectru de emisie, constând din linii, moleculele un spectru de benzi, compus din linii foarte apropiate, iar corpurile solide și gazele dense un spectru continuu. De asemenea, era cunoscută proprietatea atomilor de a absorbi radiații cu aceleași lungimi de undă pe care le

puteau emite, frecvențele de emisie și absorbție fiind specifice fiecărei specii atomice, intensitatea fenomenului fiind dependentă de concentrație.

În perioada 1930 – 1940 metodele utilizate în spectroscopia atomică au fost bazate pe excitarea în arc sau scânteie. În 1928 s-a realizat primul arzător cu cameră de amestecare pentru flacără de acetilenă – aer, cuplat cu un sistem pneumatic de nebulizare a soluțiilor, care mai apoi a fost unul din componentele esențiale ale flamfotometriei de emisie, dar și ale primelor metode de absorbție atomică. În 1953 a fost făcută prima breșă în dominația metodelor de emisie ca principală modalitate de analiză în spectroscopia atomică, prin paternarea de către Allan Walsh a procedurii de analiză prin absorbție atomică.

După anii '60 metoda de analiză prin absorbție atomică s-a dezvoltat foarte mult și datorită faptului că s-a introdus și utilizarea flăcărilor pe bază de acetilenă – peroxid de azot ca și înlocuirea făcării ca mijloc de atomizare, cu evaporarea electrotermică în cuptor de grafit.

Emisia și absorbția radiațiilor electromagnetice este datorată trecerii atomilor dintr-o stare energetică staționară la o altă stare energetică staționară. Tranzițiile energetice sunt însoțite de absorbția sau emisia de energie, iar radiația electromagnetică este absorbită dacă $E_q > E_p$ sau este emisă dacă $E_q < E_p$.

Cum stările staționare energetice (numite și nivele de energie) depind exclusiv de natura atomilor, emisia și absorbția se realizează la aceleași frecvențe. Legea dată de relația (10) reprezintă conservarea energiei pentru procese microscopice legate de radiație.

Caracteristica proceselor spectrochimice poate fi reprezentată de tranzițiile între un nivel energetic fundamental (de bază) cu energia E_b și un nivel energetic superior E_n . Tranzițiile emisie-absorbție sunt reprezentate în fig. 2-2.

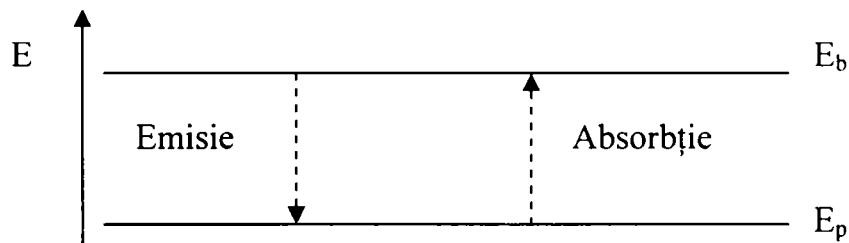


Fig. 2-2. Tranziții spectrale (emisia – absorbția)

Totalitatea radiațiilor electromagnetice emise sau absorbite de o substanță, constituie spectrul radiației electromagnetice. Pentru spectrele atomilor este caracteristică discontinuitatea lor, adică apariția unui număr finit de radiații cu frecvențe diferite, constante, așa numitul “spectru discret” sau “spectru de linii”.

Toate modelele spectrometrice de absorbție atomică Perkin-Elmer sunt capabile de a măsura atât absorbția atomică, cât și emisia atomică. Trebuie făcută precizarea că determinările efectuate în absorbție atomică sunt mult mai precise comparativ cu determinările efectuate în emisie atomică.

Fenomenul de absorbție atomică

În absorbția atomică se produce absorbția unei radiații electromagnetice la trecerea printr-un mediu cu vapori de atomi liberi ai probei. Drept mediu ce conține atomi liberi ai probei este utilizată, de obicei în absorbția atomică, o flacără produsă prin arderea unui carburant gazos în amestec cu un alt carburant gazos, în care se pulverizează o soluție ce conține dizolvată proba de analizat. Temperatura acestei flăcări, deci amediului considerat, este de aproximativ 2500°C , domeniul de temperatură în care are loc o absorbție foarte intensă. Acest fapt va conferi metodei de absorbție atomică o înaltă sensibilitate, în special pentru elementele care nu se excită în flacără și deci nu pot fi determinate flamfotometric.

Absorbția radiației de către atomii probei depinde și de alți factori, în afară de temperatură și de natura probei.

Fenomenul de emisie atomică

Fenomenul de emisie a radiației electromagnetice este legat de variația momentului electric sau magnetic al tranziției energetice, variație corespunzătoare, din punct de vedere clasic, variației momentului electric sau magnetic al sistemului.

Din punct de vedere clasic, emisia radiației de către un atom poate fi considerată corespondența emisie electromagnetice a unei sarcini în vibrație. Deci, dacă considerăm o sarcină $\pm e$ ce efectuează oscilații armonice liniare cu o anumită amplitudine “ a ” și cu o frecvență “ ν ” în jurul unei poziții de echilibru putem calcula energia ce caracterizează spectrul respectiv. Măsurând apoi absorbția integrată (absorbția pentru radiația de rezonanță) putem de asemenea, determina concentrația în elementul de analizat.

Există câteva diferențe de bază între emisia atomică și absorbția atomică. Astfel, folosind emisia atomică, flacăra are dublu rol: convertește aerosolii probei în vapori de atomi și apoi datorită temperaturii atomii trec într-o stare excitată. Când acești atomi revin la starea de bază (energia de bază) aceștia emit o radiație luminoasă care este detectată de aparat. Intensitatea radiației luminoase emise este proporțională cu concentrația elementului din soluție pentru care se face determinarea (Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrometry, 1994).

Metodele de spectrometrie sunt considerate la ora actuală cele mai răspândite metode de analiză moleculară și elementală. În cadrul acestor metode spectrochimice, una dintre cele mai reprezentative metode de determinare elementală calitativă și cantitativă este spectrometria atomică.

2.6.3. Caracteristici metodologice

Atomizarea în spectroscopia de absorbție atomică

Spectroscopia de absorbție atomică (AAS) face parte din metodele optice UV-VIS și se bazează pe măsurarea puterii radiante absorbite de către o populație de atomi liberi. Întrucât la temperatura obișnuită numai mercurul metalic poate furniza vapori de atomi liberi, probele trebuie atomizate prin încălzire. Mijloacele de evaporare și atomizare, care s-au impus în AAS, sunt flacăra și evaporarea electrotermică. În cazul utilizării flăcării, avem spectrometrie de absorbție atomică în flacăra (FAAS), iar în cazul evaporării electrotermice, avem spectrometrie de absorbție atomică cu evaporare electrotermică (ETV-AAS). Dintre evaporatoarele electrotermice, se remarcă cuptorul de grafit, tehnica fiind simbolizată (GF-AAS).

Intensitatea unei raze de lumină ce pleacă din sursa primară de radiație (a), este atenuată prin absorbție (b) la trecerea prin mediul ce conține atomii liberi ai probei. Se selectează cu ajutorul unui monocromator (c), din radiația trecută prin mediul absorbant (b), o anumită frecvență, corespunzătoare frecvenței absorbite de atomii elementului de analizat; cu un detector foarte sensibil (d) se măsoară apoi intensitatea acestei radiații. Curentul electric (e) se amplifică și se măsoară (reprezentat în fig. 2-3)

Proba lichidă este introdusă în flacăra, sub formă de aerosol, obținut cu ajutorul unui nebulizator. Datorită temperaturii flăcării, solventul se evaporă și proba este descompusă până la faza de atomi. De asemenea, în funcție de temperatura flăcării, atomii pot să rămână pe nivelul energetic fundamental sau să sufere un proces de excitare, caz în care trec pe unul sau mai multe nivele energetice excitate.

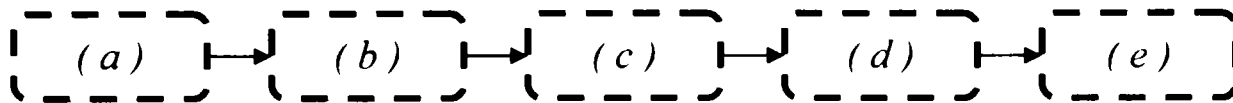


Fig.2-3. Schema bloc a montajului de realizare a absorbției atomice.

Spre deosebire de emisie, care operează cu atomii în stare excitată, absorbția atomică operează cu atomi în stare fundamentală. În cazul utilizării unei flăcări ca sursă de atomizare, caracterizată printr-o temperatură mult mai mică decât o plasmă, majoritatea atomilor rămân în starea fundamentală, ceea ce conferă o sensibilitate deosebită absorbției atomice. Aceasta se explică prin faptul că dacă în emisia atomică flacăra are rol atât de excitare, cât și de atomizare, în absorbție rolul principal este atomizarea probei.

Sursa de radiație, de obicei o lampă cu catod cavitărilor (HCL), emite o linie spectrală îngustă, caracteristică elementului de analizat. Fasciculul luminos emis, modulată mecanic sau electronic, străbate flacăra, care conține vaporii atomici ai analitului. Atomii, aflați pe nivelul energetic fundamental, absorb o parte din radiația sursei, ceea ce determină o scădere a puterii radiante transmise prin flacăra. Prin analogie cu spectrofotometria de absorbție moleculară, flacăra poate fi considerată o "cuvă de atomi" dinamică, unde se formează continuu atomi liberi. Semnalul luminos transmis prin flacăra este transformat de un fotodetector, într-un semnal electric, care este apoi amplificat. După demodulare, semnalul este înregistrat sau transformat într-o mărime digitală, care este afișată.

O altă deosebire esențială între emisia și absorbția atomică este modul de selectare a liniei analitice. Dacă în emisie monocromatorul are rolul atât de izolare a benzii spectrale de trecere, cât și de selectare a liniei analitice, în cazul absorbției, are rolul de izolare a benzii spectrale și de poziționare pe maximumul liniei analitice, emisă de lampa cu catod cavitărilor. Lampa cu catod cavitărilor este selectată, în funcție de elementul analizat. Aceasta îi conferă absorbției atomice pe lângă sensibilitate și o selectivitate mărită. De obicei, din spectrul de emisie a lămpii se selectează linia de rezonanță. De asemenea, monocromatorul rezolvă unele interferențe spectrale, care pot să apară între linia de rezonanță și fondul spectral emis de flacăra.

Sensibilitatea absorbției atomice depinde de doi factori: gradul de atomizare a probei, respectiv absorbția radiațiilor provenite de la lampa cu catod cavitărilor, de către atomii aflați în starea fundamentală. Sensibilitatea este direct proporțională cu gradul de atomizare al analitului. Pentru a mări gradul de atomizare al probei, mai ales în cazul elementelor greu de analizat, se utilizează metode speciale de introducere a probei în atomizor, una dintre acestea fiind tehnica hidrurilor. De asemenea, sensibilitatea este mai mare în situația în care linia de absorbție este mai largă decât linia de emisie. Această condiție este îndeplinită de o lampă cu catod cavitărilor, care emite linii atomice foarte înguste.

Atomizarea în flacăra

Combinările dintre un oxidant și un combustibil sunt utilizate aproape exclusiv pentru absorbția atomică, iar cele mai des utilizate amestecuri sunt aer-acetilenă sau protoxid de azot-acetilenă.

În spectrometria de absorbție atomică se folosesc diverse amestecuri pentru atomizarea în flacăra astfel: propan – aer, acetilenă – aer, acetilenă – protoxid de azot (Cordoș și Manoliu, 1983; Lajunen, 1992 – citat de Cordoș și Frențiu, 1998).

Flacăra propan – aer a fost printre primele utilizate în AAS, la determinarea elementelor care formează ușor atomi (metale alcaline, cadmiu, cupru, plumb, argint și zinc). Temperatura flăcării este relativ joasă și stabilitatea mecanică nu este dintre cele mai bune.

Flacăra acetilenă – aer este cea mai des utilizată datorită unei sensibilități și reproductibilități în ceea ce privește caracteristicile mecanice și termice. Flacăra preamestecată are un fond optic suficient de scăzut pentru absorbție atomică și este relativ silențioasă. Temperatura este suficient de mare pentru a determina în bune condiții cca 35 de elemente frecvent analizate.

Flacăra acetilenă – protoxid de azot a fost introdusă abia în anul 1965 în practica analitică și are proprietăți analitice conferite de temperatura ridicată, viteza de ardere mică și o zonă interconală cu caracter reducător. Caracterul reducător al zonei interconale se datorează prezenței în concentrație mare a radicalilor $=C=$, $-CN$, $\equiv CH$. În această zonă se pot determina elemente care au tendința de a forma oxizi refractari (Macarovici, 1979).

Atomii substanței de cercetat sunt excitați prin energia unei surse de radiații având o frecvență egală cu frecvența liniei de rezonanță a atomilor respectivi. Această frecvență este absorbită și, ca urmare, intensitatea radiației care străbate flacăra este micșorată. Intensitatea radiației absorbită este proporțională cu numărul atomilor prezenți în flacăra și cu grosimea stratului absorbant, fiind independentă de temperatura flăcării și de energia de excitație a atomilor.

Cantitatea de energie luminoasă absorbită din raza emisă de lampa cu catod scobit (cavitar) este proporțională cu concentrația atomilor de element din probă.

Atomizarea electrotermică sau în cuptor de grafit

Spre deosebire de absorbția atomică în flacăra, atomizarea electrotermică (ETV) utilizează cuptorul de grafit, filamentele descoperite sau cuptoarele creuzet verticale. În timp ce în flacăra proba este introdusă continuu, în cazul atomizării electrotermice, proba de ordinul microlitrilor este introdusă discontinuu în atomizor, unde este supusă unui program termic de prelucrare. Sensibilitatea mărită pentru ETV se datorește abilității de a atomiza întreaga probă într-un timp scurt și de a reține un timp relativ lung (peste o secundă) o cantitate mare de atomi în fața fasciculului optic. Dacă se utilizează cuptorul de grafit, proba poate fi depusă direct pe peretele tubului sau pe o platformă. Mecanismul de formare a atomilor liberi depinde de mai mulți factori, cum ar fi: natura com pușilor prezenți în cuptor la temperatura de atomizare, materialul din care este confecționat tubul cuptorului sau platforma, atmosfera din interiorul cuptorului, viteza de încălzire și temperatura de operare a cuptorului sau a platformei. Pentru o absorbantă maximă, viteza de formare a atomilor trebuie să fie cel puțin egală cu viteza cu care atomii părăsesc atomizorul.

$$\left(\frac{dN}{dt}\right)_{\text{intr}} = \left(\frac{dN}{dt}\right)_{\text{ieș}} \quad (11)$$

Din zona de absorbție, atomii sunt îndepărtați prin procese de difuzie, expansiune și convecție a gazelor, respectiv prin recombinație. Alura semnalului de absorbție este determinată de raportul dintre atomii furnizați și atomii îndepărtați din calea fasciculului optic. Pentru atingerea performanțelor analitice maxime, procesele care au loc în etapa de atomizare trebuie bine cunoscute. Comportarea analitului în cuptor este determinată de proprietățile chimice și fizice ale acestuia. Matricea analitului joacă, de asemenea, un rol important. Astfel, pentru determinarea unui element, cunoscând matricea acestuia, se pot alege condițiile cele mai potrivite pentru determinarea elementului respectiv.

Temperatura în cuptorul de grafit poate ajunge până la 3000°C. Pentru analiza fiecărui element, trebuie întocmit un program de temperaturi pentru cuptor. În general, programul include patru etape: uscarea, calcinare, atomizare și curățire. Programul termic depinde nu numai de natura elementului și a matricii, ci și de tehnica de atomizare utilizată, în tub sau pe platformă.

2.6.4. Aplicații analitice

Descompunerea probei injectată în cuptorul de grafit se realizează după un program de temperatură care include următoarele etape: uscarea, preatomizarea și atomizarea.

Uscarea probei injectate în tubul de grafit presupune de fapt evaporarea solventului. Această operație se realizează sub control, în așa fel încât evaporarea solventului să aibă loc lent. Dacă solventul este îndepărtat printr-o încălzire rapidă, proba formează o spumă sau nu este împrăștiată în incinta cuptorului. În acest caz, o parte din particulele probei părăsesc tubul fiind purtate de curentul de gaz. S-a stabilit empiric, că timpul în secunde este de până la de 2 ori volumul în microlitri de probă, folosit în determinare. Astfel, pentru atomizarea în tub a unui volum de 20 μL soluție apoasă, sunt necesare 30–40 sec. În cazul solvenților neapoși, temperatura și timpul necesar uscării vor avea alte valori datorită temperaturilor de fierbere și tensiunilor superficiale diferite. Solvenții organici au tensiuni superficiale scăzute și, din această cauză, umezesc foarte ușor grafitul și după încălzirea tubului (cuvetei), solventul are tendința de împrăștiere. Temperatura de uscare poate fi menținută constantă (uscarea izotermă) sau poate avea o rampă de temperatură pe un interval dat. Alegerea uneia dintre aceste două variante depinde, în mare măsură de tipul matricii probei.

Preatomizarea are scopul de a volatiliza componentele matricilor organice și anorganice în mod selectiv din probă, lăsând elementul analizat într-o matrice mult mai puțin complexă. Pe parcursul acestei etape temperatura crește foarte mult pentru a face posibilă evaporarea componentelor matricii, dar sub pragul de temperatură la care se volatilizează elementul analizat. La cuptoarele cu încălzire longitudinală se precedează frecvent la răcirea cuptorului înainte de etapa de atomizare (Beaty și Kerber, 1993).

Atomizarea este etapa în care are loc producerea atomilor liberi de analiti, prin încălzirea rapidă a probei la 2000 – 3000°C. Atomizarea în cuptorul de grafit depinde de natura probei și de comportamentul termic al analitului. Atomizarea poate fi rezultatul a două mecanisme: descompunerea termică sau disocierea compușilor, pe de o parte, respectiv reducerea oxidului metalic pe suprafața fierbinte de grafit, pe de altă parte. Diferența dintre cele două mecanisme este dată de participarea activă a materialului cuvei (carbonul) în disocierea moleculelor probei. De asemenea, atomizarea metalelor poate avea loc prin desorbție sau volatilizare, caz în care se evaporă cristalele formate în etapa de uscare – calcinare. În figura 2-4 se prezintă un spectrofotometru de absorbție atomică în flacără, iar fig. 2-5 prezintă un aparat SAA cu cuptor de grafit de tipul “Analyst 100” produs de firma Perkin Elmer.

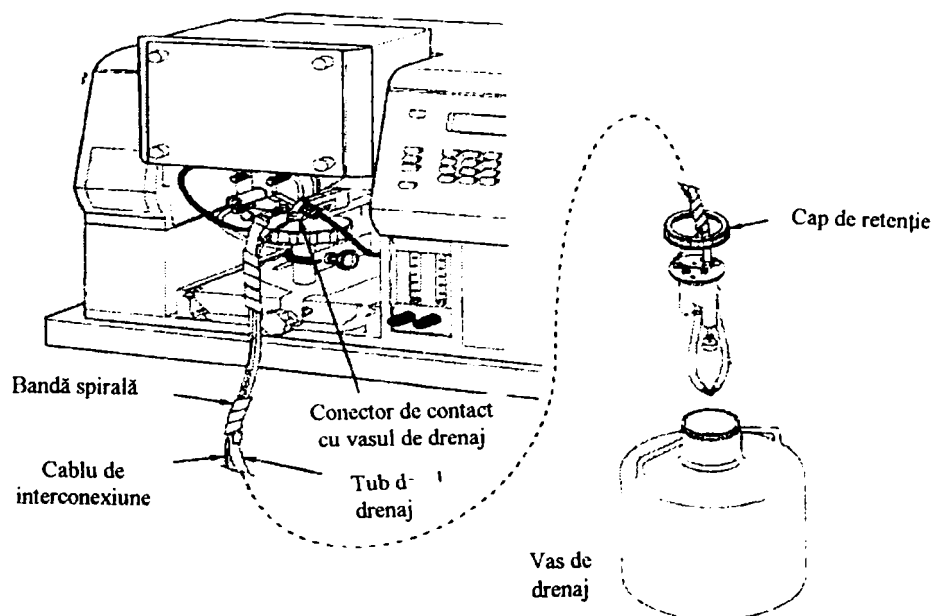


Fig. 2-4. Spectrofotometru de absorbție atomică în flacără de tipul “Analyst 100”.

concordanță cu efectul lumii străine. Linia de rezonanță și cea neabsorbită interferată, pot fi separate de un monocromator de înaltă rezoluție. Un alt caz de interferență este acela în care există suprapunere spectrală în sursa de atomi. În acest caz interferența are linia de absorbție suficient de apropiată de linia de rezonanță a analitului pentru a absorbi o parte din intensitatea acesteia. Rezultatul în acest caz este eronat în sens pozitiv (deoarece concentrația determinată a analitului apare mai mare decât cea reală). Suprapunerea spectrală este eliminată prin separarea elementului interferent din probă, sau dacă este posibil prin utilizarea unei alte lungimi de undă de lucru.

Se poate spune mai concis că interferențele spectrale apar când există absorbție continuă sau de bandă și apare împrăștierea radiației, aceasta manifestându-se atunci când o bandă de absorbție a unei molecule, existentă în flacără, este situată în jurul lungimii de undă de rezonanță a analitului.

Interferențele spectrale se manifestă predominant în spectrometria de emisie atomică, unde, pe lângă elementul de analizat, emit și alte specii din probă și chiar flacăra însăși. Pentru spectroscopia de absorbție atomică interferențele spectrale sunt relativ puțin și nu prezintă o problemă deosebită.

Interferențele fizice – rezidă în modificarea caracteristicilor fizice ale soluțiilor care urmează a fi măsurate (vâscozitate, tensiune superficială, presiune de vapori, temperatură). Astfel, modificarea unor proprietăți ale soluțiilor are efect asupra vitezei de aspirare, a nebulizării, transportului de aerosol, evaporării solventului, vaporizării analitului și împrăștierei luminii.

Uzual, în tehnica spectroscopiei de absorbție atomică se utilizează soluții diluate în scopul apropiării proprietăților fizice ale acestora cu cele ale solventului pur. Dacă soluțiile de probă conțin cantități mari de acid, săruri sau compuși organici atunci proprietățile fizice se modifică. Astfel, se știe că soluțiile cu concentrații ridicate au o vâscozitate ridicată, ceea ce duce la modificarea vitezei de aspirare și nebulizare, iar cu cât vâscozitatea este mai mare cu atât mai mic este semnalul de absorbție.

Evitarea acestor interferențe se poate face prin utilizarea aceluiași solvent pentru probe și standard, dar și prin realizarea unor concentrații egale de acid și săruri (concentrația sărurilor se recomandă să fie sub 0,5%) în toate soluțiile de măsurat.

Interferențele chimice – sunt determinate în principal de atomizarea incompletă a elementului de analizat sau de reacția atomilor în stare de vapori cu alți atomi sau radicali prezenți în flacăra de gaz. Astfel, scade semnalul de absorbție deoarece compusul care se formează are caracteristici termochimice diferite față de cele ale analitului, fiind de cele mai multe ori mai refractar. Accentuarea interferențelor se face proporțional cu creșterea diferenței dintre temperaturile de disociere ale compusului original și ale celui nou format.

Producerea efectului depresiv este urmarea formării compușilor stabili, e.g.: scăderea absorbției pentru metalele alcalino-pământoase în prezența fosfatului, aluminatului, silicatului și a altor oxoanioni; depresia semnalului pentru calciu în prezența proteinelor.

Se cunoaște faptul că pentru metalele alcalino-pământoase scade semnalul de absorbție în prezența ionilor fosfat (PO_4^{3-}) care sunt dificil de vaporizat. Un alt exemplu de interferențe datorate cationilor este acela între aluminiu și metalele alcalino-pământoase. Astfel, determinarea Mg din probele analitice este dificilă în prezența unor cantități mari de Al deoarece se formează oxidul mixt de MgAl_2O_4 stabil termic. Pentru eludarea interferenței Al asupra determinărilor de Ca și Mg se procedează la adăugarea de Sr în probă și soluțiile standard.

De asemenea sensul de absorbție crește ușor în cazul HCl, se diminuează brusc proporțional cu creșterea concentrației de H_2SO_4 și scade mai lent în cazul HNO_3 (datorită faptului că azotații și sulfatii se descompun în flacără direct în oxizi, iar clorurile formează mai întâi atomi liberi și mai apoi aceștia sunt oxidați).

Atenuarea interferențelor chimice se poate face prin îndepărtarea anionului interferent sau prin adăugarea unui exces de anion interferent în probă și soluțiile standard; prin utilizarea flăcărilor fierbinți, adaosul de săruri ale metalelor grele; prin reducerea particulelor sau scurtarea timpului petrecut de analit în flacără. În fază solidă interferențele cresc proporțional cu scăderea temperaturii flăcării.

Interferențe de ionizare – se referă la faptul că atomii analitului sunt parțial ionizați în flăcările fierbinți, ceea ce duce la scăderea semnalului de absorbție, fiind impăortant pentru metalele alcalino-pământoase și alcaline. Acest efect poate fi redus sau eliminat prin adăugarea în probă și standardele de calibrare a unui element în exces care ionizează mai ușor decât analitul. Acestea este motivul pentru care la determinarea concentrației metalelor alcaline prin spectrometrie se lucrează adesea în flăcări cu temperaturi joase.

2.6.5.2. Interferențe în atomizarea în cuptorul de grafit

În acest caz apar erori de măsurare datorate absorbției de fond și emisiei provenite de la cuptorul de grafit, dar și datorită interferențelor fizice și chimice (datorate probei).

Interferențele fizice – sunt legate de vâscozitatea și tensiunea superficială a soluției în probă. Tensiunea superficială afectează răspunsul analitic și dispersia soluției în interiorul cuptorului. Astfel, în perioada de atomizare numărul total de atomi ai elementului în tub este același, eficiențele de atomizare sunt diferite (datorită dispersiilor diferite) determină distribuții atomice variabile. Din aceste motive este importantă stabilirea volumului de probă injectată cuptor și injectarea de volume egale de probă și soluții de calibrare.

Interferențele chimice sau efectele de matrice – pot modifica semnalul de absorbție al analitului datorită reactivilor utilizați și matricei probei și a efectelor pe care le produce formarea de compuși stabili sau volatili.

Spre exemplu, în determinarea aluminiului, în etapa de calcinare, CO, H_2 și Cl_2 produc interferențe. Oxidul de aluminiu este stabil până la temperatura de $1800^\circ K$, dar în prezența CO și H_2 la $1500^\circ K$ au loc pierderi din acest element. Starea grafitului este uneori importantă în determinarea aluminiului, întrucât apa rămasă în tub nu formează o suprafață în timpul atomizării, ceea ce înseamnă că pentru obținerea unor rezultate bune, aceste elemente trebuie excluse. Cantitatea de CO care se formează pe parcursul programului de temperatură la atomizarea electrotermală depinde de calitatea tubului de grafit, respectiv tub acoperit sau neacoperit cu grafit (Frech et al, 1986).

În cazul formării compușilor stabili semnalul corespunzător unui element este diminuat datorită unei viteze mai mici de formare a numărului de atomi liberi (efect de temperatură) sau datorită numărului total de atomi liberi. Deoarece efectul este același pentru probă și standarde exactitatea determinărilor nu este afectată, dar este influențată negativ limita de detecție, fapt ce poate fi împiedicat prin utilizarea argonului ca și gaz de purjare a cuptorului în loc de azot.

În cazul formării compușilor volatili elementul de analizat se poate pierde în etapa de calcinare a probei, fapt ce poate fi evitat prin modificarea matricei. Astfel, foarte importantă este interpretarea curbelor de calcinare – atomizare care indică temperatura

maximă la care poate fi calcinată o anumită probă. Datorită faptului că halogenurile metalice sunt mai volatile decât oxizi metali corespunzători se preferă utilizarea oxiacizilor în tehnicile de preparare a probelor.

Mărirea sensibilității, limitei de detecție, scăderea interferențelor matriceale se realizează cu mult mai bine folosind pentru atomizare electrotermală tubul de grafit cu platformă L'vov inserată (Frech et al., 1982).

Modificarea matricii este o procedură care are ca scop reducerea sau eliminarea interferențelor de volatilizare, care se poate face prin adăugarea unui reactiv în probă și standardele de calibrare. Scopul acestei operații este creșterea volatilității interferentului (matricii) sau formarea unui compus mai volatil. Astfel se poate face separarea interferentului și analitului în etapa de calcinare. Din clasa modificatorilor care acționează direct asupra matricii amintim $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ sau $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, iar din clasa modificatorilor care acționează asupra analitului amintim metalele (e.g.: amestecuri de Pb, Zn, As, Pd, sau Pd cu Mg etc.). Se pot utiliza și modificatori de matrice organici (e.g.: acid ascorbic, lactic, citric, EDTA, etc.) facilitând astfel reducerea analitului la metal și coborârea temperaturii de atomizare. În cazul utilizării modificatorilor gazoși amintim H_2 și O_2 pentru determinarea Sn, Pb, Tl, formând oxizi volatili.

Efecte de emisie a tubului de grafit – apar atunci când acesta este încălzit la temperaturi de peste 1000°C și distribuția spectrală a emisiei va fi o bandă spectrală – care pentru temperaturi mai mari ale tubului are o intensitate apreciabilă în domeniul vizibil. Astfel, emisia poate afecta semnalul detectorului, modificând linia de bază atât în sens pozitiv cât și în sens negativ, generând erori mai ales în măsurarea ariei peak-ului.

3. INVESTIGAREA OLIGOELEMENTELOR METALICE PREZENTE ÎN ȚESUTURI LA ANIMALE DESTINATE OBȚINERII DE PRODUSE ALIMENTARE

3.1. Privire sinoptică

Substanțele minerale constituie componente importante ale organismului, având rol de bioconstituenți (structural) și rol de efectori biochimici enzimatici (activatori și / sau inhibitori). Compușii cationici și anionici intervin în menținerea în limite normale a homeostaziei și a statusului morfo-fiziologic al organismului uman.

Unele din aceste substanțe minerale se găsesc în cantități mai mari acestea fiind numite macroelemente, iar altele în cantități mai mici incluzând oligoelementele și microelementele. Cantumul oligoelementelor din organismul uman nu depășește valoarea de 0,01% raportat la greutatea substanței uscate. Prezența unora din aceste elemente este obligatorie pentru buna desfășurare a tuturor proceselor biochimice și menținerea stării de sănătate a organismului, motiv pentru care sunt numite elemente esențiale (Gonțea, 1971; Ghergariu, 1980). Din această categorie făcând parte fierul, iodul, zincul, seleniul, manganul, cuprul, molibdenul, cobaltul și cromul. O altă categorie de elemente prezente în organismul uman sunt acelea care au rol posibil esențial și sunt reprezentate de fluor, nichel, siliciu, vanadiu și staniu.

În organismul uman sunt prezente și elemente cu potențial toxicogen care acced ca o consecință a contaminării mediului (alimente, apă, aer). Aceste elemente sunt reprezentate de mercur, cadmiu, plumb, bismut etc.

3.2. Importanța investigației micronutrienților metalici pentru organismul uman

Substanțele minerale intervind în interacțiile biochimice specifice metabolismelor materiale (predilect metabolismul hidro-electrolitic, dar și în metabolismul glucidic, lipidic și protidic), precum și în metabolismul energetic. Acestea participă la modularea activității enzimelor, hormonilor și vitaminelor, îndeplinind totodată un rol structural. Prin aportul acestor substanțe minerale organismul uman se poate adapta la condițiile de mediu care sunt într-o continuă schimbare. De asemenea, prezența unei stări de sănătate optime impune un aport adecvat de bioelemente și multe dintre reacțiile de răspuns la solicitările de mediu ambiant depind de existența unor concentrații minime de elemente minerale (Gonțea, 1971; Mincu, 1974).

Dacă aportul de substanțe minerale, în general, și oligoelemente în particular, este deficitar sau în exces, echilibrul biologic al corpului uman este afectat și se pot instala diverse afecțiuni. Spre exemplu, un aport deficitar în fier generează anemie, după cum expunerile în exces ale acestuia în anumite țesuturi și organe generează "diabetul bronzat" (Mogoș, 1997).

Există numeroase situații în care se produc deficiențe sau excese minerale. Un factor important în acest proces este reprezentat de folosirea nerațională a insecticidelor, fungicidelor și îngrășămintelor chimice. Astfel, se pot crea dezechilibre minerale fie prin formarea de combinații ce nu permit absorbția, fie prin formarea unor

produși chimici cu oligomineralele conținute în alimente, așa numiți compuși antagonici, care fac mineralele neasimilabile. Consumul excesiv de fibre alimentare contribuie la diminuarea absorbției substanțelor minerale din produsele alimentare.

Reduceri importante ale conținutului mineral al alimentelor pot apare și prin prelucrarea industrială a produselor alimentare cu bune proprietăți nutritive. Scăderea cantității de bioelemente poate rezulta și prin exploatarea intensivă, nejudicioasă a resurselor pe care le oferă natura. Există zone pe globul pământesc unde solul este deficitar în fier și cobalt și unde populația este supusă riscului unei anemii carentiale.

Trebuie menționat faptul că de cele mai multe ori deficiențele minerale nu se limitează doar la un singur bioelement, existând carențe multiple. Fenomenul este cu atât mai amplu, cu cât carența antrenează factorii răspunzători de potențarea biodisponibilității sau a acțiunii altor elemente minerale. Pentru o mai bună înțelegere se dă următorul exemplu: carența de zinc este responsabilă de diminuarea capacității de absorbție intestinală a altor oligoelemente, iar cea de cupru scade utilizarea fierului în procesul de sinteză a hemoglobinei.

Aportul excesiv de oligoelemente poate fi întâlnit în diverse situații, cum ar fi excesul în sol, îmbogățirea îngrășămintelor chimice cu oligoelemente cu rol de biostimulatori. Dintre acestea menționăm îmbogățirea peste valori normale cu minerale a îngrășămintelor chimice, proces ce permite creșterea peste un anumit nivel a aportului de molibden, care în concentrații normale este utilizat în prevenirea cariei dentare, dar în exces poate duce la perturbarea metabolismului nucleoproteinelor și a apariției gutei. De aceea este necesară utilizarea produșilor de fertilizare a solului cu o concentrație adecvată de minerale.

3.2.1. Implicații în fiziologie

Problema compușilor biominerali existenți în organismul uman prezintă un interes deosebit pentru fiziologie. În acest sens se menționează implicarea acestora în sistemul circulator, în procesele de digestie și absorbție a diversilor nutrienți sau contaminanți, dar și în procesele de excreție a compușilor aflați în exces în organism. Procesul de digestie, absorbție și metabolizare a compușilor minerali cu caracter cationic și anionic prezintă particularități dependente atât de structura chimică caracteristică, cât și de activitatea biologică (Mincu, 1993; Todorescu, 1982; Mogoș, 1997).

Echilibrul acido-bazic al organismului uman este reglat prin procese complexe homeostazice. Menținerea unui astfel de echilibru este posibilă prin existența sistemelor tampon, care funcționează ca “mecanisme fizico-chimice de apărare”, alături de eliminarea CO₂ la nivel pulmonar și eliminarea de minerale pe cale renală. Sistemele tampon asigură realizarea homeostaziei biochimice a mediului intern în care pH-ul este menținut în limite relativ restrânse: 7,35 – 7,45, iar rezerva alcalină oscilează în limite de 53 – 75 volume CO₂/ 100 ml sânge (Gârban, 1999).

Evaluarea echilibrului acido-bazic presupune modificarea pH-ului sanguin. În acest caz, dacă perturbările din organism determină depresia pH-ului apare starea de acidoză, iar în cazul în care pH-ul crește apare starea de alcaloză.

În laboratoarele de biochimie se determină presiunea osmotică sanguină (e.g.: osmolaritatea plasmei sanguine), când se poate evalua statusul fiziologic al unor funcții din organism. Un astfel de exemplu ar fi funcția renală cu rol de excreție a unor minerale având ca scop final realizarea homeostaziei hidro-electrolitice.

Poate pentru a motiva importanța biomineralelor din organismul uman este necesară prezentarea succintă a câtorva dintre rolurile acestor compuși: contribuie la procese de morfogeneză, intervin ca efectori (activatori / inhibitori) enzimatici, mențin în limite fiziologice presiunea osmotică și oncotică (presiune coloid-osmotică) a mediilor lichidiene, participă la formarea sistemelor tampon și sistemelor bioelectrice de la nivel de membrană celulară, sunt constituenți ai unor efectori biochimic, etc.

În ceea ce privește studiul compoziției chimice elementare a materiei vii, aceasta se efectuează cu metode cunoscute ale chimiei analitice. Totuși analiza chimică elementară a materiei vii oferă puține date pentru explicarea manifestărilor caracteristice vieții. Astfel, toate elementele chimice care intră în compoziția materiei vii au o serie de proprietăți comune. Acestea se găsesc din abundență la suprafața pământului, mai ales dizolvate în apă, ceea ce influențează includerea lor în structurile vii.

3.2.2. Implicații în fiziopatologie

Aportul de bioelemente din mediul înconjurător variază mult atât din punct de vedere al speciilor chimice, cât și din punct de vedere al cantității acestora. Aceste bioelemente provin din mediul (alimente, apă, aer, sol) în care se află individul respectiv. Există numeroase cazuri în care aportul de bioelemente nu este bine corelat cu necesarul organismului (Guthrie, 1975; Mincu, 1980; Mogoș, 1993; Miu și Drăgotoiu, 2000).

Mecanismele homeostatice asigură controlul nivelelor compatibile fiziologic pentru diverși bioelectroliți. În cazul persistenței unui dezechilibru între micronutrienți există posibilitatea dereglării funcțiilor organismului, ca urmare a ingerării continue a unor diete neechilibrate stabilite sau a expunerii excesive în medii deficiente sau supraîncărcate în ceea ce privește concentrația unuia sau mai multor elemente.

În unele cazuri, în procesul de absorbție se produc o serie de interacțiuni între diferite elemente chimice și cel mai adesea implică competiția pentru centrii activi ai sistemelor de transport transmembranar. Astfel, se explică faptul că absorbția fierului în exces scade mult, dependent de creșterea concentrației în calciu, cupru, mangan și zinc. Similar, aporturi crescute de zinc scad absorbția cuprului și cromului, după cum acestea în exces afectează negativ utilizarea zincului (Williams, 2003).

De importanță majoră sunt și implicațiile de natură toxicologică datorate modificării proporției calitative în bioelemente. Tocmai pentru a defini mai bine aceste noțiuni este utilizat termenul de “nivel de securitate” pentru elementele cu potențial toxicogen crescut, dependent de gradul în care sunt prezentate elementele care pot afecta absorbția sau retenția lor. Astfel, toxicitatea cadmiului este atenuată de prezența unui anumit cantum de zinc sau seleniu și în mai mică măsură de prezența manganului și a cuprului (Popa și Stănescu, 1981).

De asemenea, s-a constatat experimental faptul că argintul, cadmiul, cuprul și mercurul conferă protecție față de efectele toxice ale seleniului, dar aceasta se realizează prin mecanisme diferite. S-a semnalat faptul că selenoza poate fi prevenită dacă se menține un raport de 1:1 între seleniu și mercur sau între seleniu și cupru. Dar totuși, seleniul la rândul său poate proteja organismul față de efectele nocive ale unor elemente, în special ale mercurului. În acest sens, în urma unor cercetări efectuate în Anglia în 1975, s-a observat că acumularea concomitentă a mercurului și seleniului în țesuturile și organele minerilor din minele de mercur, sub raport de 1:1, a fost fără efecte nocive asupra indivizilor, mulți dintre ei fiind pensionați de vârstă și nu ca urmare a expunerii la nivele toxice de mercur timp îndelungat (Grecu et al., 1982).

După cum s-a arătat mai sus, modificarea concentrației unui microelement poate constitui cauza unei îmbolnăviri. Datorită faptului că cuantumul unui element în diferite organe este o rezultată a interacțiunii mai multor factori, se recomandă a se cerceta organismul în care microelementul și-l exercită cu predilecție acțiunea fiziologică sau fiziopatologică, sau să se țină seama de valorile mai multor elemente și de raportul acestora.

Corelarea datelor privind conținutul surselor de apă în “metale în urme” și cancerul, au confirmat că, în cazul plumbului se observă o mortalitate ridicată prin cancer renal, gastric, intestinal, ovarian, leucemie. De asemenea, în cazul beriliului se observă existența unei mortalități crescute datorită cancerului osos, uterin și mamar, dar și frecvența scăzută a cancerului în cazul seleniului, care este ridicată în cazul cadmiului. Concentrația seleniului în diferite tumori permite utilizarea sa în diagnosticul tumorilor cerebrale și osoase, iar ^{67}Ga permite detectarea limfoanelor maligne.

Pentru a elimina plumbul din organism aflat în concentrații ce depășesc valorile normale sanguine (plumbemie), se administrează sare monocalică disodică a acidului etilendiaminotetraacetic (Ca-EDTA-Na_2), care formează cu plumbul și alte metale alcaline și alcalino-pământoase, chelați și se elimină în scurt timp pe cale renală. Astfel, chelatul de plumb este reținut sub formă neionizabilă și își pierde proprietățile sale toxice.

Și în intoxicațiile cu crom se recurge la tratament cu unguent (la nivelul pielii și a mucoaselor – septului nazal) pe bază de Ca-EDTA-Na_2 în concentrații de 5-10% care reduce prin chelatare cromul hexavalent în trivalent, îl inactivează și micșorează astfel efectul nociv și sensibilizant.

Analog, și pentru tratamentul hidrargirismului acut (intoxicației cu mercur) datorat unui aport de mercur anorganic se recurge la chelatarea mercurului, dar în forma cronică acest tratament este inoperant datorită manifestărilor neuropsihice (leziunile cerebeloase și cerebrale sunt ireversibile) – Țurcanu, 1978.

Deoarece bolile cardiovasculare constituie principala cauză a mortalității în țările industrial-avansate, echilibrul oligoelementelor din organism și mediu, modificat în mod adecvat prin alimentație, ar putea constitui un factor important în reducerea incidenței acestora. Asupra acestei probleme s-au desfășurat numeroase cercetări, efectuate sub egida WHO (World Human Organization) și au vizat relația dintre aportul de oligoelemente și necesarul acestora.

Tulburările patobiochimice de interes clinic întâlnite la om și animale de laborator se datoresc deficitului sau excesului unor elemente, ceea ce duce la existența unei insuficiente cunoașteri a rolului și interacțiunilor multiple și complexe ale acestora în alimentație, respectiv starea de sănătate sau boală. Relația individ – mediul înconjurător și echilibrele stabilite între microelementele din organism și mediu, constituie parametrii importanți în evaluarea stării de sănătate sau de boală a unei populații.

Produsele de tipul xenobioticelor sunt importante pentru cercetările fundamentale și aplicative. În acest context se consideră că xenobiotica vizează produsele străine de organismul uman. În literatura de specialitate se precizează că <<xenobioticele sunt chimicale sau microorganisme, sau chiar paraziți străini de sistemul biologic>>. Impactul dintre organismul uman și xenobioticele de natură chimică interesează și regnul animal și vegetal. Din punct de vedere biomedical, se studiază xenobioticele de interes alimentar, între care se includ și aditivii alimentari și substanțele poluante pentru alimente (e.g.: metale cu potențial toxicogen). Alături de acestea se află și xenobioticele de interes

farmaceutic utilizate în terapie și în diagnostic. Xenobioticele conțin diverși compuși din clasa biomineralelor.

Importanța investigațiilor analitice și bioanalitice asupra micronutrienților metalici din produse alimentare și din organism este relevată de datele fiziologice și fiziopatologice (Daranyi et al., 1996; Vincu et al., 1998). Cercetările efectuate asupra metalelor prezente în mușchi și organe de la animale domestice – prezentate în acest capitol – au urmărit relevarea cuantumului unor bioelemente metalice și a unor metale cu potențial toxicogen. ,

3.3. Investigarea unor micronutrienți metalici din țesuturi animale

3.3.1. Prelevarea probelor

Investigațiile care s-au efectuat în vederea determinării conținutului de bioelemente metalice și metale cu potențial toxicogen s-au bazat pe aplicațiile spectroscopiei de absorbție atomică – metodă de acuratețe care a impus și o prelevare riguroasă a probelor analitice. Etapa de prelevare a probelor s-a desfășurat în cadrul secției “Frigorifer” a S.C. “TIMCAR GRUP” S.A. Timișoara - probe de organe de la suine și S.C. “AGIL” S.R.L. Timișoara – probe de țesut muscular și organe de la bovine.

Prelevarea probelor s-a efectuat de la carcasele și subprodusele rezultate în urma sacrificării animalelor (bovine și suine). Aceste probe s-au prelevat din camera de refrigerare, la o temperatură de 0-4°C.

S-a urmărit selectiv regiuni musculare identice pentru probele de carne: e.g.: regiunea lombară (mușchiul longissimus dorsi), regiunea scapulară (mușchiul deltoideus) și regiunea femulară (mușchiul biceps femoris) pentru bovine. De asemenea, s-au recoltat și probe de organe (ficat, rinichi, cord și limbă) pentru probele vizând subprodusele de abataj.

După recoltare, probele au fost depuse în eprubete prevăzute cu dop, care au fost numerotate pentru a avea o evidență riguroasă a acestora. Până în momentul în care s-a început pregătirea analitică a probelor, acestea au fost păstrate în frigider la temperaturi de congelare (între -18 și -20°C).

În timpul lucrărilor de prelevare a probelor s-a folosit echipament corespunzător, respectiv halat alb, bonetă și mănuși chirurgicale. De asemenea, recoltarea probelor s-a făcut prin utilizarea de ustensile corespunzătoare din punct de vedere igienico-sanitar, bisturiu și pense sterilizate. Detașarea anumitor părți anatomice de la carcasă prin tranșare s-a realizat în cooperare cu medici veterinari, specialiști în domeniul tehnologiei cărnii. Toate măsurile igienico-sanitare s-au luat în vederea evitării contaminării primare a probelor, precum a produselor depozitate. Păstrarea probelor nu s-a realizat în ustensile de laborator sau industriale confecționate din metal, tocmai pentru a nu exista posibilitatea modificării conținutului în elemente metalice a probelor de analizat, cu riscul unor erori experimentale.

Prelevarea probelor s-a făcut astfel, deoarece reprezintă etapa primară, premergătoare determinării analitice unor elemente metalice din produsele alimentare de origine animală, căreia trebuie să i se acorde o atenție deosebită pentru a asigura acuratețea rezultatelor.

3.3.2. Pregătirea probelor analitice

Pregătirea analitică a probelor este operația care face de fapt legătura între etapa de prelevare a probelor și determinarea concentrației elementelor metalice.

Probele s-au pregătit în condiții optime, conform metodelor descrise în capitolele referitoare la metodologia analitică, pentru a permite apoi determinarea prin spectroscopia de absorbție atomică a cuantumului în anumite elemente metalice.

Prima operație de pregătire a probelor constă în decongelarea acestora până la temperatura de aproximativ 10 – 15°C. După această operație preliminară, se procedează la cântărirea probelor la balanța analitică. În acest scop, s-a folosit o balanță analitică tip “SARTORIUS 2462” – care are o precizie analitică de 0,0001g. Din proba analitică s-a cântărit o cantitate de 2,50g.

Fiecare probă a fost transferată cantitativ într-un creuzet. Creuzetele au fost spălate, uscate și răcite în exicatori înainte de utilizare. Proba din creuzet se supune unei operații de incinerare pentru distrugerea materiei organice. Se poate parcurge și o etapă de preincinerare (precalcinare) care este premergătoare operației de incinerare. Aceasta se poate realiza pe reșou electric sau bec de gaz, pe o sită de azbest și sub nișă, deoarece se degajă gaze de combustie. Operația de precalcinare se poate face și în calcinator, când proba de analizat se introduce în cuptorul de calcinare rece, procedându-se treptat la o încălzire a cuptorului la temperatura de 100 – 150°C, până nu se mai degajă gaze de combustie. Dezavantajul acestui procedeu este faptul că degajarea de gaze de combustie se face în laborator, cuptorul nefiind așezat sub nișa de evacuare a gazelor.

După distrugerea materiei organice se poate ridica temperatura cuptorului direct la 450±25°C sau treptat – prima dată la 300°C timp de 2-3 ore și apoi la 450±25°C. În investigațiile din cadrul acestei lucrări s-a menținut proba la temperatura de 450±25°C, temperatură considerată “temperatura de calcinare” timp de 30-48 de ore, până când cenușa a fost de culoare alb-cenușie, fără puncte negre sau de altă culoare. După o prealabilă răcire, eventualele urme organice, rezistente la temperatura de calcinare, se oxidează prin tratare cu câteva picături de HNO₃ concentrat, urmată apoi de uscare pe baie de nisip și apoi recalcinare la 450±25°C timp de 1-2 ore.

În absența unor rezidii organice proba răcită s-a tratat cu câteva picături de apă bidistilată, astfel ca aceasta să fie complet umectată și apoi cu 1 ml HCl 6n. Reziduul s-a transformat astfel în cloruri, iar excesul de acid s-a îndepărtat prin evaporare pe baie de apă sau baie de nisip moderat încălzită. Operația de umectare cu apă, tratare cu HCl 6n și evaporare la sec s-a mai repetat o dată.

Clorurile și acidul fosforic din reziduu se extrag cu volume repetate de câte 5 ml HCl 0,5n folosindu-se o baghetă de sticlă pentru triturare în creuzet și trecerea cantitativă a soluției clorhidrice într-un balon cotat de 50 ml (prin pâlnie uscată, fără filtru). Se spală creuzetul și pâlnia cu HCl 0,5 n până când lichidul din balonul cotat ajunge aproape la semn. După răcirea soluției la temperatura camerei, balonul se completează la semn cu HCl 0,5n și se omogenizează. Se filtrează apoi într-un flacon din material plastic, perfect uscat prin hârtie de filtru de porozitate medie neumectată (cu diametru de 5,5 cm).

Baloanele cotate cu soluția obținută se închid etanș. Dacă dozarea prin metoda SAA nu se face imediat, este necesar ca aceste probe să se păstreze la frigider, iar înainte de dozare să fie ținute câteva ore la temperatura camerei și agitate din nou pentru omogenizare.

Pentru fiecare serie de determinări se face și o probă martor (sau probă oarbă), lipsită de cenușa provenită de la incinerare, la care se urmărește același caracter analitic de pregătire a probei și succesiune de operații ca și în cazul probelor de analizat. Aceasta este utilizată la trasarea curbei etalon folosită pentru determinările cantitative efective.

3.3.3. Determinări cantitative

Pentru determinarea cantitativă a unor elemente metalice prevăzute în protocolul experimental s-a utilizat un spectrofotometru de absorbție atomică, model "PYE UNICAM SP. 1900", cu lămpi – având catod special corespunzător elementelor care s-au dozat.

În investigațiile efectuate s-a urmărit determinarea cantitativă a unor metale prezente în organism și cunoscute pentru faptul că intră în constituția unor metaloproteine de natură enzimatică, a unor bioconstituenți tisulari sau caracterizate prin rolul de efectori biochimici în procesele ana- și/sau catabolice. Astfel de elemente metalice, cunoscute și sub numele de bioelemente, urmărite în dozările noastre au fost zinc (Zn), cupru (Cu), cobalt (Co) și mangan (Mn).

De asemenea, s-au urmărit decelarea unor metale cu potențial toxicogen prezente în carne și organe, ajunse în organism prin procese de translocare, probabil datorită poluării nutrețurilor, a apei și/sau a mediului în care au crescut animalele. Prezența acestor elemente în carne și organe poate fi însă atribuită și unor procese tehnologice din industria alimentară, în cursul cărora este posibilă contaminarea (e.g.: vase de transport, rastele de stivuire, cârlige etc.). Din grupa unor astfel de elemente considerate "metale cu potențial toxicogen" s-au urmărit: plumbul (Pb), cadmiul (Cd), cromul (Cr) și nichelul (Ni). Cuantumul acestor metale s-a stabilit, de asemenea, analitic, prin metoda SAA.

În cazul dozărilor prin metoda SAA, citirea valorilor se face urmând o anumită tehnică de lucru care trebuie respectată. Astfel, se deschide aparatul cu cca 30 de minute înainte de lucru, iar funcționalitatea lămpilor catodice se verifică cu aproximativ 15 minute înaintea începerii măsurătorilor. Se reglează pe rând fiecare parametru operațional pentru a defini punctul de "0" pe scala aparatului. Apoi se cuplează compresorul de aer, se deschide robinetul buteliei de acetilenă și se aprinde flacăra, aspirând din tubul capilar apă bidistilată și demineralizată. Se reglează, de asemenea, poziția (înălțimea) arzătorului pentru a stabili punctul de "0" în raport cu apa bidistilată și demineralizată. În constituire se procedează la aspirarea succesivă a soluției standard, măsurând absorbția pentru fiecare element în parte. Curba etalon se trasează pentru fiecare serie de determinări și pentru fiecare etalon.

În vederea trasării curbei etalon se folosesc o serie de 6 baloane cotate de 50 ml cu concentrații diferite ale elementului respectiv. Se reprezintă apoi grafic absorbția în funcție de concentrație.

Concentrația (C) a elementului chimic cercetat, exprimat în mg/Kg sau μg/g produs (reprezentând ppm), se calculează cu ajutorul formulei:

$$C = \frac{(a \times V)}{m} \quad (\mu\text{g/g})$$

unde: a – valoarea citită pe curba etalon (în μg);
V – volumul total al soluției supuse determinării (50 mL);
m – masa probei luată în lucru (în g), în cazul de față 2,50g.

După determinarea cantitativă a elementelor metalice menționate mai sus, rezultatele se pot prezenta sub formă tabelară.

Datele obținute se pretează interpretării în raport cu sursa de recoltare, importanța pentru nutriție, aspectele contaminării, utilitatea biomedicală, posibilul risc în cazul depistării unor concentrații crescute peste limitele admise.

3.3.4. Studiul metalelor prezente în mușchi și organe

Investigațiile analitice prin metoda spectroscopiei de absorbție atomică s-au efectuat asupra unor probe de mușchi și organe prelevate de la două specii de animale diferite: suine (porc) și bovine (vită). În acest context, pentru bovine, au existat repere musculare identice: regiunea lombară (mușchiul longissimus dorsi), regiunea scapulară (mușchiul deltoideus) și regiunea femurală (mușchiul biceps femoris). De asemenea, s-au prelevat și analizat cantitativ probe de organe: ficat, rinichi, cord și limbă pentru bovine, iar pentru suine doar rinichi și limbă.

Prelevarea de probe s-a realizat de la bovine și suine, investigându-se două grupe de metale, prima dintre acestea considerate ca biometale (Zn, Cu, Co, Mn), iar secunda grupă considerate metale cu potențial toxicogen (Pb, Ni, Cr, Cd).

Pentru organismul uman este important de știut cuantumul acestor elemente metalice în produsele alimentare. Trebuie menționat faptul că toate substanțele minerale, chiar și cele esențiale pentru procesele biochimice, pot deveni poluante dacă apar în doze crescute, modificând biodisponibilitatea organismului și relația doză-efect. În cazul în care concentrația biometalelor este scăzută pot apare boli carentiale.

Seria de analize efectuate pentru decelarea biometalelor din mușchi prelevați de la bovine este prezentată în tabelul 3.1.

Tabel 3.1. Concentrația biometalelor, dozate prin SAA, din mușchi prelevați de la bovine ($\mu\text{g} / \text{g}$)

Specificare	Nr. probe	Biometale investigate			
		Zn $\bar{X} \pm DS$	Cu $\bar{X} \pm DS$	Co $\bar{X} \pm DS$	Mn $\bar{X} \pm DS$
m. longissimus dorsi	15	17,03 \pm 4,39	0,39 \pm 0,14	0,28 \pm 0,12	0,09 \pm 0,04
m. deltoideus	15	28,96 \pm 5,03	0,44 \pm 0,09	0,30 \pm 0,11	0,08 \pm 0,03
m. biceps femoris	15	22,54 \pm 7,21	0,57 \pm 0,24	0,42 \pm 0,10	0,11 \pm 0,06

Datele analitice obținute au fost transpuse și sub formă histografică pentru a se putea observa cu ușurință cuantumul comparativ de biometal, respectiv metal cu potențial toxicogen, din părțile anatomice prelevate și supuse apoi prelucrării analitice. Astfel, figura 3.1. prezintă histograma cu unele biometale în mușchi, din probe prelevate de la bovine adulte.

Reprezentarea histografică a fost realizată separat pentru zinc și separat pentru cupru, cobalt și mangan pentru că ordinul de mărime al concentrațiilor (pentru zinc zeci de $\mu\text{g}/\text{g}$, iar pentru cupru, cobalt și mangan subunități de $\mu\text{g}/\text{g}$) nu permitea reprezentarea sub forma unei singure histograme.

Concentrația zincului în mușchi de bovine ($\mu\text{g/g}$)

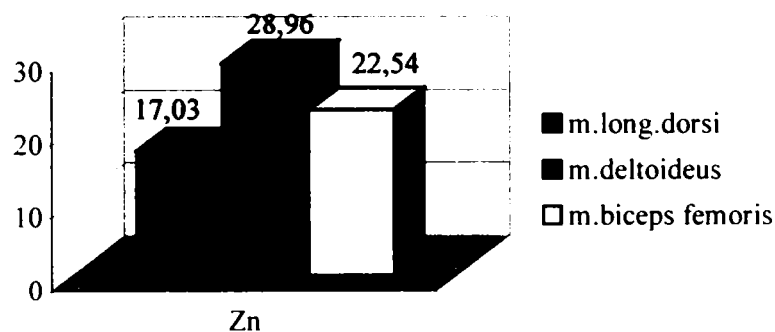


Fig. 3.1. Distribuția zincului în mușchi din diferite zone anatomice la bovine

Conform celor prezentate în histograma din figura 3.1. se poate observa că zincul în cazul bovinelor este mai bine reprezentat în mușchiul deltoideus din regiunea scapulară, urmat de mușchiul biceps femoris din regiunea femurală și mai apoi de mușchiul longissimus dorsi din regiunea lombară.

Concentrația unor biometale în mușchi de bovine ($\mu\text{g/g}$)

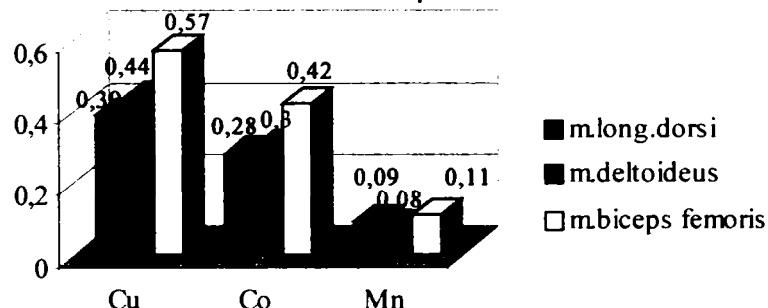


Fig. 3.2. Distribuția unor biometale în diferite zone anatomice (mușchi) la bovine

Histograma din figura 3.2. prezintă distribuția cuprului, cobaltului și manganului în mușchi de bovine din trei zone anatomice diferite. Astfel se observă că dintre cele trei biometale, cuprul este cel mai bine reprezentat, urmat de cobalt și mai apoi manganul. De asemenea, se poate afirma că în aproape toate cele trei cazuri (excepție face manganul) mușchiul biceps femoris este cel mai concentrat în cupru și cobalt, urmat de mușchiul deltoideus și mai apoi mușchiul longissimus dorsi. Manganul, în cazul de față – mușchi prelevați de la bovine – este, de asemenea, cel mai bine reprezentat în mușchiul biceps femoris, urmat de mușchiul longissimus dorsi și apoi de mușchiul deltoideus.

Un studiu recent a arătat că zincul, alături de calciu, influențează frăgezimea mușchiului (cotlet) de vită la un anumit interval de timp după sacrificare prin modificarea activității unor enzime. Astfel, probe de cotlet de vită, de la animale sacrificate cu 72 de ore înainte, au fost injectate cu soluții de CaCl_2 de concentrații diferite (0,0 sau 0,05 sau 0,1 sau 0,2 sau 0,4 M) alături de o soluție de ZnCl_2 0,5 M sau doar cu soluții de concentrații diferite de CaCl_2 și au fost depozitate timp de 15 zile. În urma acestui

tratament s-a observat că injectarea de $ZnCl_2$ a inhibat profund frăgezimea, chiar și atunci când mușchiul a fost injectat și cu $CaCl_2$. În absența $ZnCl_2$, dar la injectarea cu soluții de 0,4 M și 0,4 M $CaCl_2$ mușchiul a fost cu 32,1 respectiv cu 18,9% mai fraged decât mușchiul netratat cu nici una din cele două săruri. Micrografiile electronice de transmisie (transmission electron micrographs) au arătat că injectarea mușchiului cu $CaCl_2$ alături de $ZnCl_2$, au produs mai frecvente rupturi și a determinat o împrăștiere laterală miofibrilară. Acest fapt sugerează că a fost perturbată activitatea enzimatică la nivel miofibrilar și că degradarea enzimatică determinată de calciu pare să fie mecanismul principal al tenderizării (Lawrence et al., 2002).

Un factor important al concentrației unor minerale din mușchi și organe la animale domestice este vârsta. Astfel, în funcție de vârsta animalului există modificări importante cu privire la cantumul de biominerale din sânge, dar și la nivel de mușchi sau organe. Acest fapt este cel mai bine observat în cazul fetușilor (Smith et al., 1998).

În ultimile decenii s-au recurs la diverse metode de preparare a produselor alimentare în vederea obținerii unor calități organoleptice și fizico-chimice de excepție, dar și cu scop de a permite depozitarea acestor produse pe perioade de timp mai îndelungate cu costuri relative scăzute. Astfel s-au obținut produse de abataj provenite de la bovine și suine sub formă de pudră sau pastă care permite o reconstituire rapidă cu păstrarea calității produselor inițiale (mușchi sau organe). Determinările cantitative de biometale și metale cu potențial toxicogen la mușchi de bovină sub formă de pudră pot oferi date despre conținutul unor micronutrienți sau contaminanți.

În continuare se redau unele dintre biometalele analizate din pudră de mușchi de bovină (Cod de catalog N 8414) astfel: zinc – 142 mg / Kg; cupru – 2,84 mg / Kg; mangan – 0,37 mg / Kg și cobalt – 0,007 mg / Kg (Food and Agriculture – Meat, Catalogue of Certificate Reference Materials 2000-2001).

Determinările cantitative de biometale din probe de tip pudră de ficat (Cod de catalog C 8551) prelevate de la bovine au prezentat următoarele concentrații: zinc – 172 mg / Kg; cupru – 17,2 mg / Kg; mangan – 8,32 mg / kg și cobalt 0,100 mg / Kg (Food and Agriculture – Meat, Catalogue of Certificate Reference Materials 2000-2001).

Studii referitoare la conținutul în unele biominerale a unor produse alimentare de origine animală (mușchi) s-au realizat și de către United States Department of Agriculture (USDA). Astfel, conținutul din cotlet de vită a fost pentru calciu 12 mg / 100 g; fosfor 196 mg / 100 g; fier 3,2 mg / 100 g. Determinări similare din pulpă de vită au prezentat calciu 11 mg / 100 g; fosfor 195 mg / 100 g; fier 2,9 mg / 100 g (Nutrition – Documenta Geigy, 1973; Handbook of the Nutritional Contents of Food – United States Department of Agriculture, 1977).

Calitatea subproduselor de carne se află atât în atenția producătorilor de carne, cât și în atenția managerilor din fermele zootehnice. Din aceste motive se întreprind diverse experimente care să ducă la obținerea unor produse animaliere de calitate superioară. În Danemarca s-a realizat un studiu pe suine la care s-a administrat cupru ca supliment în furaje în doze de 125 ppm cupru sub formă de $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, urmărindu-se obținerea de bacon de calitate. Astfel, suplimentarea furajelor cu cupru la un grup de suine cu greutate cuprinsă între 20 și 90 Kg a condus la sporirea în greutate a animalelor cu 5%, iar la grupul de suine cu greutate de 50 – 90 Kg nu s-a observat nici o sporire în greutate. De asemenea, s-a observat că animalele la care s-a făcut suplimentarea cu cupru au prezentat un strat de grăsime mai mic la nivel de bacon, îmbunătățind astfel calitatea cărnii (Madsen și Hansen, 1981).

Tabelul 3.2. prezintă cuantumul unor biometale (zinc, cupru, cobalt și mangan) în organe (cord, ficat, rinichi și limbă) prelevate de la bovine adulte.

Tabel 3.2. Concentrația biometalelor, dozate prin SAA, din organe prelevate de la bovine ($\mu\text{g} / \text{g}$)

Specificare	Nr. probe	Biometale investigate			
		Zn $\bar{X} \pm DS$	Cu $\bar{X} \pm DS$	Co $\bar{X} \pm DS$	Mn $\bar{X} \pm DS$
Cord	19	11,36±4,83	1,37±0,22	0,25±0,09	0,18±0,07
Ficat	22	22,72±7,14	14,28±5,06	0,28±0,12	1,28±0,42
Rinichi	22	14,04±3,12	2,46±0,93	0,21±0,08	0,55±0,20
Limbă	15	3,42±0,93	0,09±0,01	0,03±0,01	urme

Cordul, ficatul și rinichii sunt organele vitale ale oricărui organism, iar funcționarea acestora și starea de sănătate sunt preocuparea tuturor. Dintre biometalele analizate zincul este elementul cel mai bine reprezentat, urmat de cupru și mai apoi cobaltul și manganul. Histograma din figura 3.3. prezintă variația concentrației zincului și cuprului menționate în tabelul de mai sus.

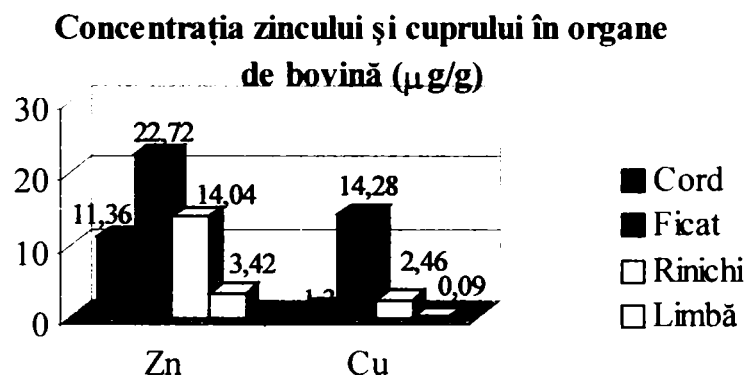


Fig. 3.3. Cuantumul zincului și cuprului în diferite organe de bovine

Se observă detașat că ficatul este sediul în care sărurile minerale sunt cel mai bine reprezentate, acest organ este sediul metabolismului lipidelor și are rolul de detoxifiere a organismului. De asemenea, în ficat se găsesc o serie de enzime, cum ar fi ceruloplasmina, citocromoxidaza, liziloxidaza, monoaminooxidaza, superoxid-dismutaza, ascorbicoxidaza, tirozinaza enzime cu funcții vitale în organism.

Astfel, concentrația zincului este cea mai mare în ficat ($22,72 \mu\text{g}/\text{g}$), urmată de o concentrație mult mai mică în rinichi ($14,04 \mu\text{g}/\text{g}$) și cord ($11,36 \mu\text{g}/\text{g}$), pentru ca în limbă concentrația zincului să fie de aproximativ 7 ori mai mică decât în ficat ($3,42 \mu\text{g}/\text{g}$). În cazul cuprului ficatul conține cel mai mare cuantum, iar diferența dintre concentrația de cupru din ficat ($14,28 \mu\text{g}/\text{g}$) și rinichi ($2,46 \mu\text{g}/\text{g}$) este de aproximativ 7 ori mai mare. Cuprul în cord ($1,37 \mu\text{g}/\text{g}$) este reprezentat în concentrație apropiată cu cea din rinichi, iar în limbă concentrația de cupru este foarte mică ($0,09 \mu\text{g}/\text{g}$).

Un studiu realizat asupra calităților nutritive ale produselor animaliere de către Departamentul de Agricultură a Statelor Unite a demonstrat că există diferențe semnificative de quantum al unor biominerale în funcție de specie dar și de vârstă (United States Department of Agriculture, 2003). Astfel, din datele referitoare la cunatumul de zinc, cupru și mangan din organe de animale domestice (mg / 100 g parte edibilă crudă) se poate evidenția: concentrația zincului în rinichi este de 11 la vițel și 6 la vită; quantumul de cupru din rinichi este de 0,494 la vițel și 0,469 la vită; concentrația de mangan din rinichi este de 0,080 la vițel și 0,102 la vită. Datorită faptului că rinichiul este organul la nivelul căruia se excretă efectiv surplusul de minerale și alte substanțe aflate în exces se explică buna reprezentare a zincului, cuprului și manganului în astfel de concentrații. Ficatul este sediul multiplelor procese metabolice, este organul responsabil și de detoxifierea organismului și poate din acest motiv se explică o concentrare a mai multor biominerale la acest nivel comparativ cu alte organe vitale (e.g.: cordul). Quantumul de zinc, cupru și mangan din ficat prelevat de la animale domestice (mg / 100 g parte edibilă crudă) este: pentru zinc – 4,03 la vițel și 3,92 la vită; pentru cupru – 5,83 la vițel și 3,339 la vită; iar pentru mangan – 0,077 la vițel și 0,264 la vită.

De asemenea, concentrația unor biominerale din cord este, de asemenea, diferită de ficat și rinichi. Astfel, concentrația unor biominerale din cord prelevat de la bovine (mg / 100 g parte edibilă crudă) este de 1,47 zinc la vițel, 2,38 zinc la vită; 0,340 cupru la vițel și 0,361 cupru la vită; iar quantumul manganului din cord este de 0,036 la vițel și 0,041 la vită (United States Department of Agriculture, 2003).

Un alt studiu privind quantumul de biominerale din organe prelevate de la bovine a arătat că în cord concentrația a fost: 5 mg / 100 g calciu; 195 mg / 100 g fosfor; 4,0 mg / 100 g fier; 86 mg / 100 g sodium și 193 mg / 100 g potasiu. Probele de ficat de bovină au prezentat variații de concentrația astfel: 8 mg / 100 g calciu; 352 mg / 100 g fosfor; 6,5 mg / 100 g fier; 136 mg / 100 g sodium și 281 mg / 100 g potasiu. De asemenea, determinările cantitative de biominerale din limbă de bovină au relevant: 8 mg / 100 g calciu; 182 mg / 100 g fosfor; 2,1 mg / 100 g fier; 73 mg / 100 g sodium și 197 mg / 100 g potasiu. Dozările de biominerale din probe de rinichi de bovină au prezentat diferențe după cum urmează: 11 mg / 100 g calciu; 219 mg / 100 g fosfor; 7,4 mg / 100 g fier; 176 mg / 100 g sodium și 225 mg / 100 g potasiu (Nutrition – Documenta Geigy, 1973; Handbook of the Nutritional Contents of Food – United States Department of Agriculture, 1977).

În histograma 3.4 se prezintă concentrația cobaltului și manganului în cord, ficat, rinichi și limbă din probe prelevate de la bovine.

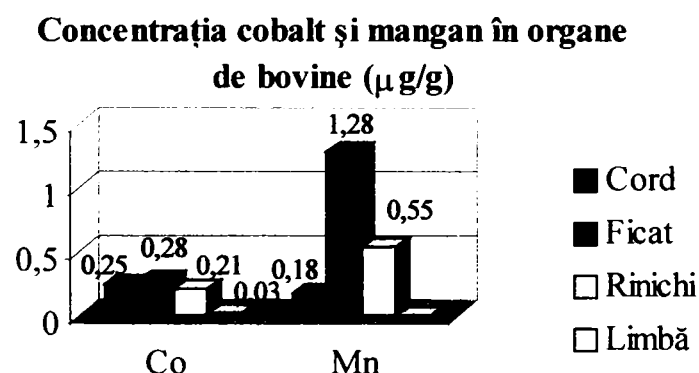


Fig. 3.4. Quantumul cobaltului și manganului în organe de bovine

Din prezentarea histografică din figura 3.4. se observă că în ficat, cord și rinichi cobaltul este prezent în cantități relativ egale, iar limba este aproape lipsită de acest biometal, concentrația de cobalt fiind foarte mică. Față de cazul celorlalte biometale prezente în organe prelevate de la bovine adulte, cobaltul este prezent în concentrații foarte apropiate în ficat (0,28 $\mu\text{g/g}$) și cord (0,25 $\mu\text{g/g}$), iar rinichiul are un quantum puțin mai redus (0,21 $\mu\text{g/g}$). Se cunoaște faptul că în ficat se produce o detoxifiere a organismului și acest organ este sediul unor procese metabolice. Cordul este organul în care organismul depozitează cobaltul și astfel se și explică faptul că în ficat și cord concentrația de cobalt este foarte apropiată. Cobaltul în limbă însumează – în cazul determinărilor din această lucrare – doar 0,03 $\mu\text{g/g}$.

Manganul este bine reprezentat în ficat (1,28 $\mu\text{g/g}$), urmat de o concentrație mai mică în rinichi (0,55 $\mu\text{g/g}$) și foarte mică în cord (0,18 $\mu\text{g/g}$), pentru ca în limbă concentrația de mangan să fie foarte mică – nedecelabilă în soluția de analizat.

Pentru a se putea observa relația dintre concentrația unor metale în diverse organe se are în vedere și vârsta. Astfel, un studiu realizat în Norvegia a urmărit concentrația de zinc din pancreas și ficat la bovine cu vârsta sub 3 ani și peste 3 ani, în cazul unor diete cu concentrații adecvate de zinc. Quantumul de zinc la bovinele sub 3 ani a fost 28 $\mu\text{g/g}$ țesut umed în pancreas și 36 $\mu\text{g/g}$ țesut umed în ficat. Animalele mai învârstă (peste 3 ani) au avut concentrații de zinc ușor mai crescute comparativ cu cele mai tinere, respectiv 31 $\mu\text{g/g}$ în pancreas și 37 $\mu\text{g/g}$ în ficat (țesut umed) – Norheim și Bjorland, 1981.

În Suedia s-au făcut determinări analitice cu privire la quantumul de vanadiu din ficat de bovine. Astfel, concentrația medie a vanadiului din ficat a fost de 0,005 mg / Kg ficat (greutate umedă). În unele zone din Suedia s-au făcut fertilizări cu compuși ai vanadiului, iar bovinele crescute în acele zone au prezentat o concentrație medie de vanadiu de 0,008 mg / Kg ficat (greutate umedă). Unele probe de ficat de bovină din aceste zone fertilizate cu vanadiu au avut concentrații de 0,019 mg vanadiu / Kg ficat – greutate umedă – care a fost ulterior stabilită ca “Highest Swedish Reference Value” (Frank și Galgan, 1995).

Tabelul următor (tabel 3.3.) prezintă quantumul unor metale considerate ca având potenția toxicogen – plumb, nichel, crom și cadmiu – din probe de mușchi prelevate de la bovine.

Tabel 3.3. Concentrația unor metale cu potențial toxicogen, dozate prin SAA, din mușchi prelevați de la bovine ($\mu\text{g/g}$)

Specificare	Nr. probe	Metale cu potențial toxicogen investigate			
		Pb $\bar{X} \pm DS$	Ni $\bar{X} \pm DS$	Cr $\bar{X} \pm DS$	Cd $\bar{X} \pm DS$
m. longissimus dorsi	9	0,64 \pm 0,35	0,47 \pm 0,25	0,05 \pm 0,03	urme
m. deltoideus	9	0,98 \pm 0,71	0,79 \pm 0,58	0,01 \pm 0,01	urme
m. biceps femoris	10	0,81 \pm 0,52	0,49 \pm 0,21	0,13 \pm 0,10	urme

Datele prezentate în tabelul anterior sunt reprezentate histografic și în figura 3.5. unde sunt redată valorile plumbului și nichelului analizate prin spectroscopia de absorbție atomică.

Concentrația plumbului și nichelului în mușchi de bovine ($\mu\text{g/g}$)

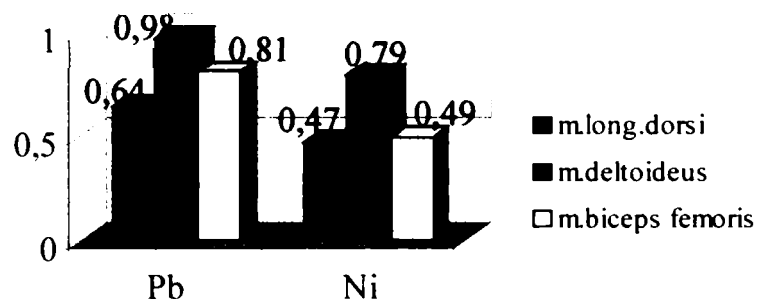


Fig. 3.5. Distribuția plumbului și nichelului în mușchi proveniți din diverse zone anatomiche de la bovine

Cuantumul metalelor cu potențial toxicogen în mediu și alimente sunt reglementate și în România, iar prezența acestora în produsele alimentare este controlată cu strictețe, existând limite maxime admise pentru fiecare categorie de produs. Astfel, conform histogramei prezentate mai sus se observă că plumbul este prezent în toate probele de mușchi prelevate de la bovine, iar cea mai mare concentrație de plumb se află în mușchiul deltoideus ($0,98 \mu\text{g/g}$), urmată de mușchiul biceps femoris ($0,81 \mu\text{g/g}$) și cel mai puțin în mușchiul longissimus dorsi ($0,64 \mu\text{g/g}$).

Nichelul este mai puțin concentrat în mușchii analizați prelevați de la bovine, iar variația este aceeași ca și în cazul plumbului. Astfel, cea mai mare concentrație de nichel fiind în mușchiul deltoideus ($0,79 \mu\text{g/g}$), urmată de mușchiul biceps femoris ($0,49 \mu\text{g/g}$) și cu aproape aceeași concentrație mușchiul longissimus dorsi ($0,47 \mu\text{g/g}$).

În figura 3-6 se prezintă cuantumul cromului și al cadmiului în diverși mușchi de bovine, probe care au fost analizate prin spectroscopia de absorbție atomică.

Concentrația cromului și cadmiului în mușchi de bovină ($\mu\text{g/g}$)

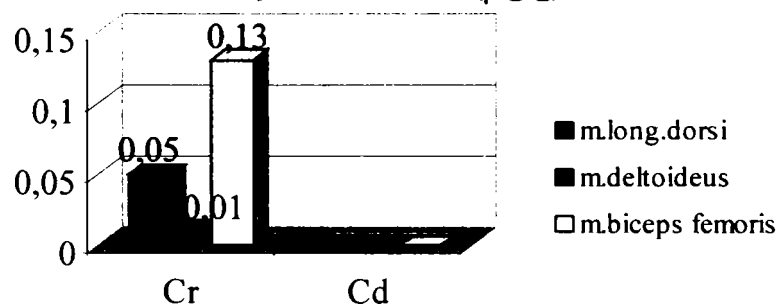


Fig. 3.6. Distribuția cromului și cadmiului în mușchi proveniți din diverse zone anatomiche de la bovine

În ceea ce privește distribuția cromului din mușchii de bovină analizați se poate spune că acesta este foarte puțin reprezentat, fiind prezent în concentrație de $0,13 \mu\text{g/g}$ în mușchiul biceps femoris, urmat de $0,05 \mu\text{g/g}$ în mușchiul longissimus dorsi și $0,01 \mu\text{g/g}$ în mușchiul deltoideus.

Cadmiul, conform atelor obținute în urma analizelor prin spectroscopie de absorbție atomică, în toate probele de mușchi prelevate de la bovine adulte nu s-a putut determina, fiind absent sau în cantitate care nu a putut să fie decelată în soluția de analizat.

În tabelul 3.4., prezentat în cele ce urmează, este redată distribuția unor metale cu potențial toxicogen în cord, ficat, rinichi și limbă, probe recoltate de la bovine.

Tabel 3.4. Concentrația metalelor cu potențial toxicogen, dozate prin SAA, din organe prelevate de la bovine ($\mu\text{g} / \text{g}$)

Specificare	Nr. probe	Metale cu potențial toxicogen investigate			
		Pb $\bar{X} \pm DS$	Ni $\bar{X} \pm DS$	Cr $\bar{X} \pm DS$	Cd $\bar{X} \pm DS$
Cord	19	0,32±0,06	0,31±0,08	0,01±0,01	urme
Ficat	22	0,81±0,13	0,50±0,17	0,03±0,01	urme
Rinichi	22	1,94±0,51	0,39±0,08	0,04±0,02	0,17±0,07
Limbă	12	0,21±0,05	0,02±0,01	0,02±0,01	urme

Cu privire la prezența unor metale cu potențial toxicogen din pudră de mușchi de bovină (Cod de catalog N 8414), cuantumul acestora este: plumb – 0,38 mg / Kg; nichel – 0,05 mg / Kg; crom – 0,071 mg / Kg și cadmiu – 0,013 mg / Kg (Food and Agriculture – Meat, Catalogue of Certificate Reference Materials 2000-2001).

Pentru a se putea observa mai ușor variația acestor metale în figura 3.7 se prezintă histograma cu distribuția plumbului și a nichelului în câteva organe de recoltate de la bovine adulte.

Concentrația plumbului și nichelului în organe de bovine ($\mu\text{g}/\text{g}$)

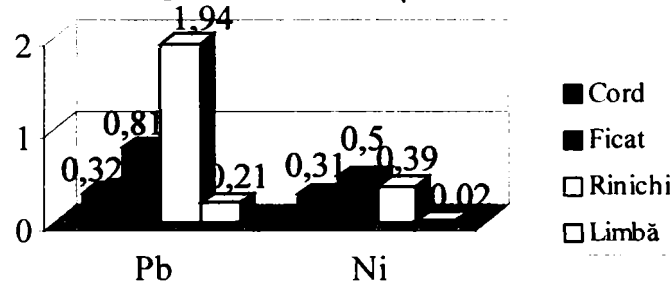


Fig. 3.7. Variația cuantumului plumbului și nichelului în organe prelevate de la bovine

Dintre organele supuse analizelor cantitative, se observă că plumbul se găsește în cantitățile cele mai mari în rinichi (1,94 $\mu\text{g}/\text{g}$), urmat de ficat (0,81 $\mu\text{g}/\text{g}$), limbă (0,32 $\mu\text{g}/\text{g}$) și cord (0,21 $\mu\text{g}/\text{g}$). Cu privire la cuantumul nichelului din organele analizate se observă că ficatul are cele mai mari depozite (0,50 $\mu\text{g}/\text{g}$), urmat de rinichi (0,39 $\mu\text{g}/\text{g}$) și cord (0,31 $\mu\text{g}/\text{g}$) și în cantități foarte mici în limbă (0,02 $\mu\text{g}/\text{g}$). O explicație a acestui fapt poate fi legată de rolul ficatului – care este organul cu rol de

detoxifiere a organismului, iar rinichiul fiind o cale de eliminare a substanțelor toxice din organism (prin urină), deci concentrația mai mare de metale în aceste organe este motivată.

În figura care urmează (fig. 3-8) se prezintă histograma cu quantumul cromului și cadmiului din câteva organe prelevate de la bovine și analizate prin SAA.

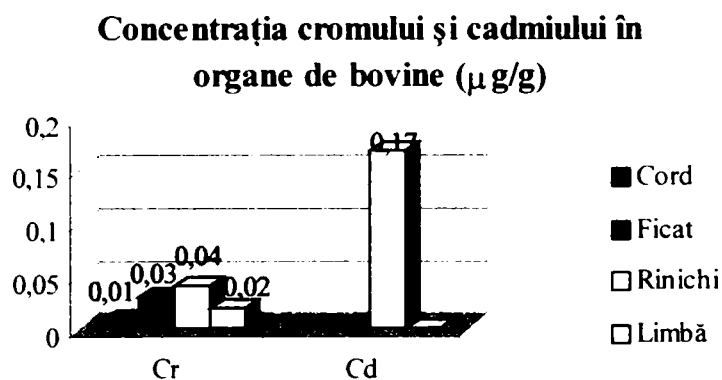


Fig. 3.8. Variația cromului și cadmiului în unele organe de bovine

Cromul și cadmiul sunt regăsite în cantități foarte mici în organele analizate, cromul fiind mai concentrat în rinichi ($0,04 \mu\text{g/g}$) și ficat de bovine ($0,03 \mu\text{g/g}$) și doar de $0,02 \mu\text{g/g}$ în limbă și $0,01 \mu\text{g/g}$ în cord. Cu privire la concentrația cadmiului din organe se poate spune că acesta are o concentrație de $0,17 \mu\text{g/g}$ în rinichi de bovine analizați și în cord, ficat și limbă nu este prezent sau concentrația este foarte mică și astfel nu a putut să fie decelată în condițiile experimentale alese.

Dintre metalele cu potențial toxicogen determinate din probe de tip pudră de ficat (Cod de catalog C 8551) recoltate de la bovine se menționează: plumb – $0,54 \text{ mg/Kg}$; crom – $0,20 \text{ mg / Kg}$ și cadmiu – $0,067 \text{ mg / Kg}$. Concentrația nichelului nu a fost redată deoarece datele analitice obținute nu au fost certificate (Food and Agriculture – Meat, Catalogue of Certificate Reference Materials 2000-2001).

Pe anumite zone din Suedia s-au făcut fertilizări cu compuși ai vanadiului. Bovinele crescute în acele zone au prezentat o concentrație medie de vanadiu de $0,008 \text{ mg/Kg}$ ficat (în greutate umedă). Cele mai mari concentrații de vanadiu în ficat de bovină în zonele fertilizate cu vanadiu au fost de $0,019 \text{ mg vanadiu / Kg}$ ficat – greutate umedă, aceasta fiind numită ulterior “The Highest Swedish Reference Value” (Frank și Galgan, 1995).

Asigurarea unei diete corespunzătoare și chiar suplimentarea dietei cu minerale și vitamine la animale domestice ar efecte directe asupra calității produselor de abataj. Astfel, eliminarea din dieta suinelor a vitaminelor și a sărurilor minerale pe o perioadă de 6 – 12 săptămâni a condus la depresia cuantumului de vitamină E din mușchiul longissimus dorsi cu 75 – 77%. De asemenea, s-a observat o scădere a concentrației de zinc în mușchiul longissimus dorsi la suinele care au avut în dietă suplimente alimentare de vitamine și minerale, comparative cu suinele la care nu s-au administrat suplimente alimentare (Edmonds și Arentson, 2001).

Concentrația unor biometale din probe de pudră de mușchi de suine (Cod de catalog C 8552) variază astfel: zinc- $94,2 \text{ mg / Kg}$; cupru – $3,88 \text{ mg / Kg}$; mangan – $0,48 \text{ mg / Kg}$; iar cobalt – $0,03 \text{ mg / Kg}$ (Food and Agriculture – Meat, Catalogue of Certificate Reference Materials 2000-2001).

Cuquantumul unor metalele cu potențial toxicogen analizate din pudră de mușchi de suine (Cod de catalog C 8552) variază astfel: plumb – $0,20 \text{ mg / Kg}$; crom –

0,39 mg / Kg. În cazul de față determinările cantitative de nichel și cadmiu nu au fost certificate și din acest motiv nu au fost publicate (Food and Agriculture – Meat, Catalogue of Certificate Reference Materials 2000-2001).

În Cehoslovacia s-au făcut studii privind conținutul de cadmiu în diverse țesuturi prelevate de la bovine după o prealabilă administrare de suplimente alimentare cu cadmiu. Astfel, o dietă obișnuită pentru bovine conține în medie cca. 0,07 – 0,08 mg / Kg cadmiu, iar suplimentarea cu cadmiu s-a făcut prin administrarea a 100 g / zi de furaje cu conținut de 0,20 – 0,67 mg / Kg cadmiu. Analiza cantitativă a conținutului de cadmiu din țesuturi a demonstrat că suplimentarea nutrițională cu cadmiu nu modifică semnificativ conținutul de cadmiu din rinichi, ficat, splină, oase, mușchi comparativ cu probele recoltate de la bovine care nu au avut furaje suplimentate cu cadmiu. Concentrația de cadmiu determinată din probe prelevate de la bovine care au avut furaje suplimentate cu cadmiu a fost: 0,40 mg / Kg în rinichi, 0,12 mg / Kg în ficat, 0,010 mg / Kg în splină, 0,004 mg / Kg în mușchi și 0,021 mg / Kg în oase (Simek et al., 2000).

Studii de specialitate realizate de cercetători din sudul Germaniei au demonstrat că există diferențe cu privire la conținutul în metale cu potențial toxicogen la probele de mușchi și organe prelevate de la suinele domestice comparativ cu cele sălbatice. Datele analitice au dovedit că la suinele sălbatice conținutul de cadmiu a fost mai mare comparativ cu suinele domestice, în cazul tuturor țesuturile investigate. În general, concentrația cadmiului din probele de mușchi prelevate de la suine domestice și sălbatice a fost aproape în toate cazurile foarte mic (20 μg / Kg țesut umed) și nu s-a depășit limita maximă admisă pentru cadmiu în nici una din probele analizate (Hecht, 1987).

În Germania s-au făcut determinări cantitative de plumb și cadmiu din probe de rinichi recoltate de la bovine. Astfel, s-a constatat că la bovine probele de rinichi care prezentau concentrații de plumb care depășeau cu mult limitele maxim admise au prezentat și concentrații ridicate de cadmiu (Steindl, et al., 1987).

Cercetările experimentale încearcă să realizeze diverse corelații între poluarea dintr-o anumită zonă geografică și conținutul în unele metale la specii de animale diferite. Astfel, un studiu realizat în USA a urmărit conținutul de crom din ficat, rinichi și sânge prelevat de la bovine care au pășunat într-o zonă în care existau deșeuri sub formă de uleiuri deversate necontrolat. Concentrația de crom în ficat a fost de 1,83 ppm, în rinichi 2,97 ppm și în sânge 0,022 ppm. În studiul respectiv s-au înregistrat mai multe pierderi de animale, astfel că 1 din 10 bovine au fost găsite moarte în zona contaminată cu uleiuri. La aceste animale s-a făcut necropsia și s-a determinat concentrația de crom din rinichi, aceasta fiind 15,8 ppm. Rezultatele acestui studiu demonstrează încă o dată că poluarea și caracteristicile mediului ambiant influențează direct calitatea vieții atât pentru om, cât și pentru plante și animale (Kerr și Edwards, 1981).

Poluarea unor zone geografice duce implicit la contaminarea solului, apei, plantelor și a animalelor, dar și a populației din mediu respectiv. Astfel, s-au făcut studii experimentale referitoare la dozarea unor biometale și metale cu potențial toxicogen din mușchi, oase, ficat și rinichi de bovine. Animalele de la care s-au prelevat probe de mușchi, oase și organe au fost crescute într-o zonă poluată cu deșeuri municipale (Marrakech City – Morocco). Rezultatele analitice au demonstrat că probele au fost contaminate cu metale cu potențial toxicogen, în special cu cadmiu. Conținutul ridicat de cadmiu se pare că a contribuit la reducerea concentrației de zinc și cupru din organe, respectiv din ficat și rinichi. Concentrația medie din rinichi a fost de 89 μg zinc / g țesut, 33 μg cupru / g țesut și 10,3 μg cadmiu / g țesut; iar din ficat a fost de 126 μg zinc / g țesut, 112 μg cupru / g țesut și 5,1 μg cadmiu / g țesut (Sedki et al., 2003).

Pentru acest studiu s-a avut în vedere și determinarea concentrației unor bioelemente metalice și unor metale cu potențial toxicogen din două organe prelevate

de la suine (porcine). Astfel, dintre biometale s-a determinat quantumul zincului, cuprului, cobaltului și manganului, iar dintre metale cu potențial toxicogen s-a determinat concentrația plumbului, nichelului, cromului și cadmiului.

În tabelul 3.5. sunt prezentate concentrațiile biometalelor prezente în rinichi și limbă, organe prelevate de la suine.

Tabel 3.5. Concentrația biometalelor, dozate prin SAA, din organe prelevate de la suine ($\mu\text{g/g}$)

Specificare	Nr. probe	Biometale investigate			
		Zn $\bar{X} \pm DS$	Cu $\bar{X} \pm DS$	Co $\bar{X} \pm DS$	Mn $\bar{X} \pm DS$
Rinichi	24	3,54 \pm 1,23	0,41 \pm 0,08	0,03 \pm 0,01	0,09 \pm 0,03
Limbă	14	3,18 \pm 0,51	0,11 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01	urme

Figura 3.9. prezintă histogramele cu distribuția zincului, cuprului, cobaltului și manganului în rinichi și limbă de porc, probe analizate prin spectroscopia de absorbție atomică.

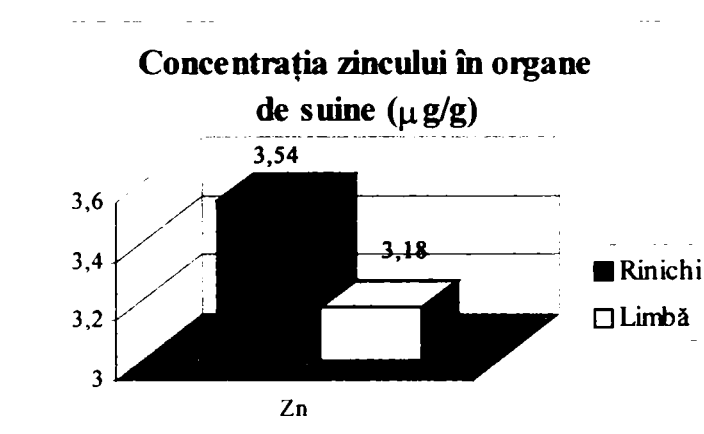


Fig. 3.9. Variația concentrației zincului în unele organe de suine

Prezentarea histografică din figura 3.9. arată o distribuție de 3,54 $\mu\text{g/g}$ zinc în rinichi de porc față de 14,04 $\mu\text{g/g}$ în rinichi de vită și 3,18 $\mu\text{g/g}$ în limbă de porc față de 3,42 $\mu\text{g/g}$ în limbă de vită. Se observă foarte ușor că în rinichii recoltați de la bovine concentrația de zinc este mult mai mare decât în același organ prelevat de la porc.

Departamentul de Agricultură a Statelor Unite (United States Department of Agriculture – USDA) a realizat un studiu privind aspectele nutritive ale produselor de origine animală menționând că există diferențe semnificative în ceea ce privește quantumul unor biominerale în funcție de specie dar și de vârstă. Rinichiul prezintă importanță fiziologică – prin funcția de excreție pe care o are și nutrițională – prin aportul de nutrienți. Din datele referitoare la quantumul de zinc, cupru și mangan din rinichi de animale domestice ($\text{mg} / 100 \text{ g}$ parte edibilă crudă) se poate evidenția: concentrația zincului este de 9 la porc și 13 la miel; quantumul de cupru din rinichi este de 0,622 la porc și 0,446 la miel; concentrația de mangan din rinichi este de 0,123 la porc și 0,118 la miel. Ficatul este sediul diverselor proceselor de biosinteză și biodegradare, având totodată și rol de detoxifiere a organismului. Quantumul de zinc, cupru și mangan din ficat prelevat de la animale domestice ($\text{mg} / 100 \text{ g}$ parte edibilă

crudă) este: pentru zinc – 5,76 la porc și 4,66 la miel; pentru cupru – 0,677 la porc și 6,979 la miel; iar pentru mangan –0,344 la porc și 0,184 la miel. Cordul conține relativ mai puține substanțe minerale comparativ cu ficatul și rinichiul. Astfel, concentrația unor biominerale din cord prelevat de la suine și ovine (mg / 100 g parte edibilă crudă) este de 2,8 zinc la porc și 1,87 zinc la miel; 0,408 cupru la porc și 0,397 cupru la miel; iar cuantumul manganului din cord este de 0,063 la porc și 0,046 la miel (United States Department of Agriculture, 2003).

În figura 3.10 se prezintă cuantumul cuprului, cobaltului și manganului în rinichi și limbă de porc analizate prin SAA.

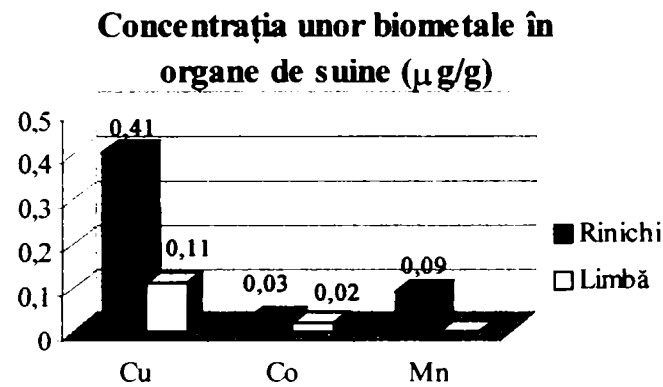


Fig. 3.10. Concentrația unor biometale în organe prelevate de la suine

Dintre cele trei biominerale analizate se observă că cea mai mare concentrație o are cuprul. Astfel, concentrația cuprului din rinichi prelevați de la suine (0,41 μg/g) este mult mai mare decât în limba prelevată de la suine (0,11 μg/g). Concentrația din rinichii de porc este mult mai mică comparativ cu concentrația cuprului din rinichii de vită (0,41 μg/g față de 2,46 μg/g în rinichi de vită). Variația concentrației din limba de porc și vită este foarte puțin variabilă (0,11 μg/g în limba de porc și 0,09 μg/g în limba de vită).

Cobaltul este mai puțin reprezentat în probele de rinichi prelevate de la suine (0,03 μg/g) comparativ cu cele prelevate de la bovine (0,21 μg/g). În ceea ce privește concentrația cobaltului din probele de limbă provenite de la suine (0,02 μg/g) aceasta este ușor mai mică comparativ cu cea din probele de limbă prelevată de bovine (0,03 μg/g).

Manganul nu este prezent în probele de limbă prelevate de la suine și bovine sau a avut concentrații extrem mici care nu au putut fi decelate în condițiile experimentale din studiul de față. Concentrația manganului din rinichii prelevați de la suine (0,09 μg/g) este aproximativ 6 ori mai mică decât în rinichii prelevați de la bovine (0,55 μg/g).

Diverse studii privind calitatea alimentelor au urmărit distribuția cantitativă a unor biominerale din produse alimentare de origine animală și anume din cotlet de porc. Astfel, determinările cantitative au arătat că în probe reprezentând cotlet de porc variația concentrația unor biominerale este: 8 mg / 100 g calciu; 161 mg / 100 g fosfor și 2,2 mg / 100 g fier (Nutrition – Documenta Geigy, 1973; Handbook of the Nutritional Contents of Food – United States Department of Agriculture, 1977).

Determinările analitice referitoare la concentrația de cupru din probe de ficat prelevate de la suine domestice au dovedit că aceasta a fost mult mai mare comparativ cu cuantumul cuprului din ficat de suine sălbatice. Concentrația de cupru din rinichi a fost mai mare la suinele sălbatice decât la cele domestice (Hecht, 1987).

Pentru determinările de unele biometale prezente în ficat și rinichi de suine s-au avut în vedere concentrația zincului, cuprului, manganului și cobaltului. Variația cantumului biometalelor studiate pentru ficat (sub formă de pastă – Cod de catalog B 7112) și rinichi (sub formă de pudră – Cod de catalog B 186) se prezintă astfel: zinc – 43,0 mg / Kg în ficat, respectiv 128 mg / Kg în rinichi; cupru – 117 mg / Kg, respectiv 31,9 mg / Kg; mangan – 3,04 mg / Kg, respectiv 8,5 mg / Kg; iar cobalt – 0,061 mg / Kg în ficat (Food and Agriculture – Meat, Catalogue of Certificate Reference Materials 2000-2001).

Un studiu realizat pe tineret suin cu vârstă cuprinsă între 3 zile și 6 săptămâni a constatat în administrarea de furaje pe bază de porumb și soia suplimentate cu 5000 ppm Zn sub formă de ZnO, iar la următoarele două diete s-a administrat lapte suplimentat cu 0,5 ppm Cu, respectiv 10 ppm Cu. Suinele la care nu s-au administrat suplimente cu cupru au prezentat carență de cupru, manifestată prin reducerea greutateii corporale, scăderea hemoglobinei și a cuprului seric, ceruloplasmina serică a fost nedetectabilă, reducerea activității citocrom-C-oxidazei la nivel de cord și ficat, precum și scăderea cantumului de cupru și zinc în diferite organe după 14-35 zile de la începerea experimentului (Hill et al., 1982).

În continuare tabelul 3.6. prezintă distribuția plumbului, nichelului, cromului și cadmiului în probe de organe prelevate de la suine.

Tabel 3.6. Concentrația metalelor cu potențial toxicogen, dozate prin SAA, din organe prelevate de la suine ($\mu\text{g} / \text{g}$)

Specificare	Nr. probe	Metale cu potențial toxicogen investigate			
		Pb $\bar{X} \pm DS$	Ni $\bar{X} \pm DS$	Cr $\bar{X} \pm DS$	Cd $\bar{X} \pm DS$
Rinichi	24	0,48 \pm 0,09	0,03 \pm 0,01	0,10 \pm 0,03	urme
Limbă	14	0,18 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01	0,06 \pm 0,02	urme

Datele prezentate în tabelul de mai sus sunt reprezentate și sub forma unor histograme. Concentrația de plumb, nichel și crom este relativ mică, fiind subunitară, în toate organele studiate, iar concentrația cadmiului nu a putut fi decelată analitic. Acest fapt poate fi explicat fie printr-un cantum foarte redus – în urme – fie prin absența acestuia. Astfel figura 3.11. arată cantumul plumbului în cele două organe de porc analizate.

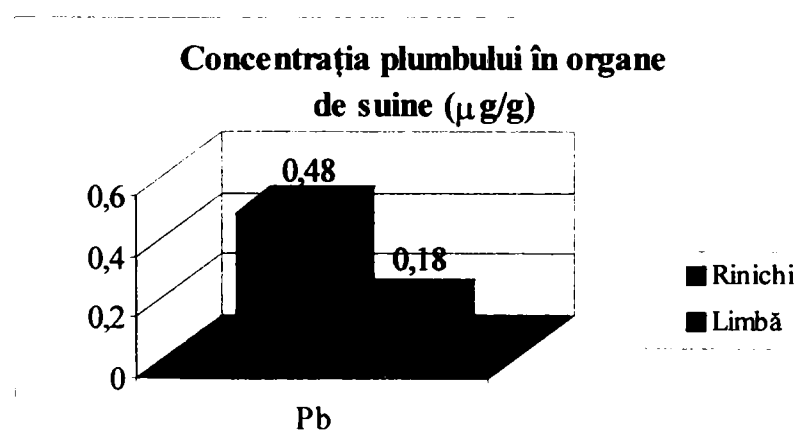


Fig. 3.11. Cantumul plumbului în unele probe de mușchi de porc determinate prin SAA

Conform datelor prezentate se observă că rinichiul conține cantități mai mari de plumb decât limba de porc. Acest fapt este explicabil deoarece rinichiul este organul care prin urină elimină o serie de substanțe cu potențial toxicogen pentru organism.

Figura care urmează (fig. 3.12) prezintă variația unor metale cu potențial toxicogen, de asemenea în rinichi și limbă prelevate de la suine și determinate prin SAA.

Datele prezentate în figură demonstrează că dintre metalele cu potențial toxicogen nichelul și cromul s-au concentrat mai mult în probele de rinichi prelevate de la suine. În ceea ce privește cadmiul, acesta nu a fost prezent în probele analizate sau a fost prezent în cantități extrem de mici (nedecelabile în soluția de analizat în condițiile experimentale date).

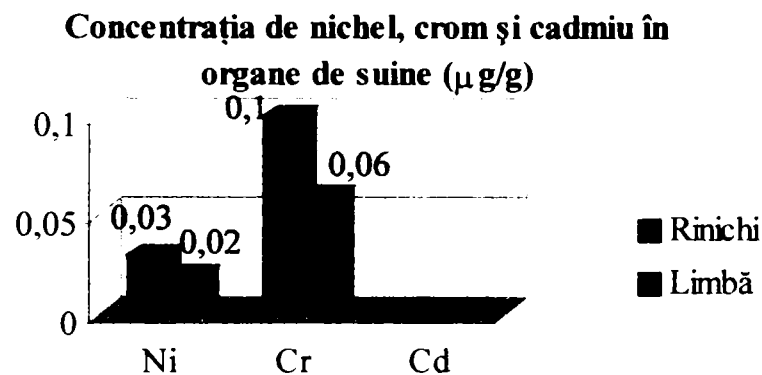


Fig. 3.12. Distribuția nichelului, cromului și cadmiului în rinichi și limbă prelevate de la suine

În probele de ficat și rinichi prelevate de la suine s-au decelat și unele metale cu potențial toxicogen, dintre care amintim plumb, nichel, crom și cadmiu. Variația concentrației metalelor cu potențial toxicogen în probele de ficat (sub formă de pastă – Cod de catalog B 7112) și rinichi (sub formă de pudră – Cod de catalog B 186) de suine este redată astfel: plumb – 0,1 mg / Kg în ficat, respectiv 0,306 mg / Kg în rinichi; nichel – 0,420 mg / Kg în rinichi, crom – între 0,058 și 0,142 mg / Kg în rinichi și cadmiu – 0,25 mg / Kg în ficat, respective 2,710 mg / Kg în rinichi (Food and Agriculture – Meat, Catalogue of Certificate Reference Materials 2000-2001).

Cercetări realizate în Germania au demonstrat că și conținutul de cadmiu din organele suinelor îngrășate în exces depinde de vârstă și este mai ridicat în ficat, și în special în rinichi. Determinările analitice din probele de ficat prelevate de la suinele domestice au depășit rareori limitele maxime admise pentru cadmiu de 0,5 mg / Kg țesut umed. Investigațiile analitice cu privire la concentrația de cadmiu din probele de rinichi de la suinele domestice au depășit în majoritatea cazurilor limitele maxime admise de 1 mg / Kg țesut umed. Cu privire la conținutul de cadmiu din ficat s-a demonstrat că 20% din probele analizate au depășit limitele maxime admise (0,5 mg / Kg țesut umed), iar concentrația de cadmiu din probele de rinichi au depășit cu mult limitele maxime admise (1 mg / Kg țesut umed) în toate cazurile investigate la probele prelevate de la suine sălbatice (Hecht, 1987).

Problema legată de distribuția unor biometale și metale cu potențial toxicogen în carne și organe la animale domestice (bovine și suine) a fost una dintre preocupările grupului de lucru de la disciplina de Biochimie alimentară – Nutriție umană din cadrul Facultății de Tehnologia Produselor Agroalimentare Timișoara. Acest grup de lucru este condus și în prezent de Prof. Dr. Gârban Zeno și a abordat aspecte legate de relația dintre

distribuția metalelor și alimente și nutriția umană (Gârban et al., 1995a; Gârban et al., 1995b; Daranyi et al., 1996; Gârban et al., 1999).

Rezultatele analitice obținute relevă cuantumul acestor metale în probele analizate. Cercetările întreprinse au drept scop evaluarea cuantumului metalelor în țesutul muscular, în organe și în deosebi a diferențelor de concentrație. Astfel de cercetări se întreprind pe produse alimentare de origine animală, dar și pe modele experimentale. Se folosesc „modele” concepute pe animale de laborator pentru a observa retenția sau acumularea în organe și adesea efectele sinergice sau antagonice. De asemenea, studii de acest fel, se corelează cu dezvoltarea industrială și cerințele corespunzătoare standardelor mondiale, precum și prevederile din “Codex Alimentarius”, WHO și FAO au impus extinderea cercetărilor în acest domeniu.

Între preocupările privind elementele metalice din alimente se menționează și un studiu de sinteză efectuat în cadrul activității de cercetare la disciplină privind conținutul metalic din diverși aditivi alimentari (Gârban et al., 1993).

Așa cum se poate observa din datele prezentate în acest capitol, alături de biometalele analizate s-au studiat și câteva metale cu potențial toxicogen. Acestea pot produce perturbarea diverselor procese metabolice, dar și leziuni ale unor organe cu rol vital pentru organismul uman (ficat, rinichi, cord) de interes atât pentru studiile noastre, dar mai ales pentru organizațiile care au în vedere cercetările din institutele de sănătate publică și protecția consumatorilor.

4. CERCETĂRI ASUPRA TRANSLOCĂRII UNOR OLIGOELEMENTE METALICE LA ANIMALE DE LABORATOR

4.1. Instituirea unui model experimental

În domeniul cercetării științifice fundamentale și aplicative, interesând biochimia, fiziologia, nutriția, farmacologia, toxicologia, etc. se folosesc frecvent modele experimentale concepute pe animalele de laborator. Astfel în investigarea acțiunii diverselor substanțe preconizate spre a fi utilizate ca aditivi alimentari, produse farmaceutice, sau în combaterea bolilor și dăunătorilor la plantele de cultură se utilizează modele animale. Pe astfel de modele se efectuează cercetări experimentale cu durată limitată, dar și unele experimente care urmăresc efectele în timp vizând efecte genetice / mutagene, teratogene etc.). Utilizarea animalelor de laborator în sfera cercetării a stat la baza dezvoltării științifice a multor domenii de vârf, deosebit de importante pentru explicarea multor aspecte din domeniul medical, precum și al nutriției, farmacologiei, toxicologiei, agrobiologiei etc.

Un prim studiu privind instituirea unui model animal realizat în cadrul grupului de lucru din care fac parte a fost inițiat încă din anul 1999. Astfel, s-au pus bazele condițiilor de pregătire a animalelor de experiență și s-a stabilit specificul metodologiei experimentale utilizate în vederea cercetării efectelor consecutive translocării de oligoelemente metalice (Vincu et al., 1999a).

Pentru cercetarea translocării unor oligoelemente metalice la animale de laborator, și în acest caz, s-a instituit un model experimental. Acest model a cuprins șobolani linia Wistar, la care s-a urmărit cu precădere caracteristicile morfofiziologice pentru a putea obține grupuri experimentale cât mai asemănătoare. S-a ales ca specie de animale – șobolanul pentru că se consideră că are caracteristici morfofiziologice asemănătoare cu specia umană. În general, rezultatele experimentale întreprinse pe șobolani (e.g.: linia Wistar) pot fi extrapolate cu succes și la om. Studiul privind translocarea unor oligoelemente metalice se referă la “trecerea” acestora din apă sau alimente prin ingestie în organismul animalelor de experiență. Pentru a avea un control cât mai exact al cantității de oligoelement metalic administrat s-a recurs la o cale de administrare orală și anume administrarea prin gavaj. Astfel s-a imitat pătrunderea oligoelementului pe calea digestivă în mod natural, respectiv odată cu ingestia alimentului sau odată cu apa.

4.1.1. Condiții de pregătire a animalelor de experiență

Cercetarea experimentală recurge tot mai mult la diverse animale de laborator care pot să ofere o analogie a mecanismelor de acțiune și a efectelor produse de diverse substanțe testate. Aceste cercetări oferă date deosebit de valoroase pentru domenii cum ar fi: fiziologia, biochimia alimentară și biochimia medicală, nutriția umană, biologia moleculară, toxicologie, farmacologie și fiziopatologie etc.

Pornind de la tema propusă, pentru acest studiu se alege și specia de animale pe care se va efectua experimentul. De asemenea, se vor avea în vedere mai multe criterii legate de animal în funcție de complexitatea experimentului. Specia animalului, rasa, greutatea corporală, sexul, vârsta, starea fiziologică sunt doar câteva criterii legate de

animal, dar alături de acestea se adaugă și date referitoare la substanțele testate. În acest caz dacă se dorește ca administrarea substanțelor testate să se facă prin proceduri speciale se va avea în vedere specia de animale care se pretează unor astfel de studii. De asemenea, dacă în final se dorește recoltarea anumitor țesuturi sau chiar probe de sânge se vor lua în studiu animale cu greutate corporală potrivită pentru astfel de cercetări.

Oportunitatea pe care o prezintă biologia experimentală – aplicată în medicină (umană și veterinară), în farmacologie, nutriție, toxicologie etc. – a făcut ca acest domeniu să utilizeze animale de laborator în testare unor substanțe și cercetare. Acest fapt a determinat dezvoltarea unei adevărate industrii de creștere și ameliorare a animalelor pentru experimente, având ca scop final obținerea unor specii și linii cât mai adecvate.

Inițial în desfășurarea unor experimente s-au folosit animale productive – care cresc obișnuit în ferme zootehnice (i.e.: cabaline, bovine, ovine, porcine și chiar păsări de curte). Aceste experimente au prezentat multe inconveniente, astfel că s-a renunțat și s-a încercat utilizarea în laboratoarele de cercetare a câinilor și pisicilor. Această idee însă a determinat asociațiile pentru protecția animalelor – care consideră aceste specii ca fiind animale excelente de agrement, însoțire și pază – să “lupte”, mai mult și chiar să obțină legi pentru protejarea acestor specii.

Astfel, în aceste condiții laboratoarele de cercetare și cercetătorii au încercat utilizarea prioritară a rozătoarelor (șoareci, șobolani etc.), alături de carnișiere (dihor) ca animale de laborator. Cele mai des întâlnite animale în scopul cercetării sunt: șoarecele, șobolanul, cobaiul, hamsterul, iepurele, broasca și gerbilul.

Creșterea în biobază trebuie să asigure un cadru cât mai bun prin asigurarea unor condiții optime de microclimat (temperatură, umiditate, ventilație, lumină, zgomot) astfel încât animalele supuse experimentelor să fie în perfectă stare de sănătate și să facă parte din specii și linii cu anumite performanțe biologice – Ciudin și Marinescu, 1996. Foarte importante sunt condițiile de microclimat, care pot influența foarte mult rezultatele obținute și pot conduce la date eronate despre studiul propus a fi realizat.

Un alt aspect esențial ar fi alimentația animalelor utilizate în studiile experimentale care se stabilește diferit în baza normelor și standardelor în vigoare. Astfel, alimentația este specifică fiecărei specii, vârste și fiecărei categorii de animale. Rația alimentară a oricărui animal va avea în vedere necesarul de glucide, proteine (aminoacizi esențiali), lipide, săruri minerale, vitamine și fibre alimentare care de asemenea este caracteristică fiecărei specii de animale (Simionovici et al., 1982).

Reproducerea animalelor în scopul folosirii ulterioare a acestora pentru diverse experimente are în vedere ameliorarea unor rase de animale sau obținerea unor linii de animale cu caracteristici specifice. Tehnicile care se aplică sunt diverse, dar cele mai utilizate sunt metoda încrucișării interrasiale și metoda încrucișării intrarasiale (Bernard, 1958; Ciudin și Marinescu, 1997).

De asemenea, prin creșterea animalelor în biobaze uneori se încearcă evitarea modificărilor negative induse de ambient cu efecte asupra comportamentului pentru a obține exemplare care se încadrează în standardele morfofiziologice ale speciei și au “parametrii” fiziologici în limite normale (hematologie, biochimie). Astfel, animalele se caracterizează printr-un comportament înnăscut sau moștenit. Cele două tipuri de comportament se pot modifica în funcție de specia sau de vârsta animalului. Un aspect particular este relevat de așa numitul comportament colectiv, de grup, sau colonii care poate fi întâlnit la agregări în cupluri sau izolați.

Obiectivul final al acestor aspecte trebuie să fie obținerea de rezultate reproductibile, obiective și care să reflecte caracteristicile proprii cercetării.

4.1.2. Specificul metodologiei experimentale utilizate

Metodologia experimentelor efectuate pe animale de laborator sunt caracterizate de câteva aspecte specifice, diferite de la procedeu la procedeu și de la animal la animal (Urai, 1992; Șerban et al., 1993). Astfel, în abordarea oricărei metodologii experimentale este necesară o bună cunoaștere a tehnicilor de conținere a animalelor, a relațiilor doză – efect, a modului de prelevare a probelor, dar și a tehnicilor de conservare a probelor biologice prelevate.

O primă etapă în procesul de recoltare a probelor pe parcursul experimentelor este conținerea animalelor. Acest lucru presupune realizarea unor condiții cât mai blânde pentru a nu stressa animalul și astfel a modifica eventualele rezultate experimentale, e.g.: se știe că pe fondul stresului se modifică o serie de enzime sanguine, lipide, glucide etc., fapt care ar duce la obținerea de rezultate experimentale eronate.

În cazul în care se dorește recoltarea probelor de sânge, dacă acestea nu se conservă corect și conform unui anume protocol, unele determinări fizico-chimice nu se mai pot face datorită coagulării sau hemolizării serului sanguin. De asemenea, prelevarea probelor de organe și țesuturi, trebuie să fie urmată de conservarea probelor, deoarece contaminarea microbiologică poate produce – în scurt timp – modificarea caracteristicilor pentru majoritatea metaboliților.

Tehnicile și metodele de conservare au în vedere tipul probei prelevate (lichide biologice, țesuturi, organe), dar și de analizele de laborator la care vor fi supuse. Astfel, pentru probe de sânge recoltate de la animale de laborator se recomandă păstrarea probelor în eprubete sterile și în termostate la 37°C până la analizarea efectivă sau centrifugarea imediată a acestora. Aceste metode sunt necesare pentru separarea serului sanguin din sânge, deoarece majoritatea metaboliților se determină din ser sanguin.

De asemenea, în cazul țesuturilor și organelor prelevate de la diverse animale de laborator în urma experimentelor efectuate se respectă prevederile și indicațiile prezentate la metoda care dorim să o folosim la determinări. Pentru studiul metalelor – știind faptul că probele vor fi calcinate – acestea se pot păstra la temperaturi de refrigerare (între 2°C și 4°C) dacă determinările se fac în maxim 24 ore de la recoltare; sau la temperaturi de congelare (între -4°C și -20°C) în cazul în care perioada de timp de la recoltare până la determinare este mai mare de 24 ore. Pentru determinarea altor metaboliți din probele de țesuturi și organe se respectă metodologia de conservare a probelor conform metodei de lucru.

Trebuie avut în vedere faptul că și condițiile, dar și tehnicile de conservare pot influența pozitiv sau negativ (pot chiar compromite) rezultatele experimentelor. Este necesar să existe o corelare foarte stânsă între parametrii fizico-chimici, microbiologici etc. care dorim să-i determinăm și prelevarea și conservarea probelor biologice. Aceste aspecte legate de modul de conservare a probelor sunt tot atât de importante și pentru probele recoltate de la animale în stare de conștiență sau anesteziate (cazul biopsiilor), cât și în cazul prelevării de probe de la animale care au fost în prealabil sacrificate (cazul necropsiilor). Buna desfășurare a tuturor etapelor din cadrul cercetării se va reflecta asupra acurateții rezultatelor experimentale obținute.

4.2. Cercetări experimentale prin utilizarea metodei gavajului

Pentru a realiza un experiment cu obiectiv de cercetare științifică în care se urmărește administrarea unei cantități exacte de substanță deseori se recurge la gavaj – metodă de administrare orală. Această metodă – așa cum s-a arătat la prezentarea generală din capitolul precedent – permite cercetătorului să urmărească efectele unei cantități dinainte stabilite care cu ajutorul unei sonde speciale este administrată direct în stomacul animalului.

Este o metodă care se realizează relativ ușor și care se pretează și speciei de șobolani linia Wistar, specie utilizată și la experimentele care fac obiectul acestui studiu.

4.2.1. Procedura administrării compușilor metalici salini

Pentru realizarea experimentului s-au ales animale de laborator specia (*Rattus norvegicus*) – șobolani linia Wistar, de culoare albă, de sexe diferite și cu caracteristici morfofiziologice cât mai asemănătoare. S-a urmărit greutatea corporală, stadiul de dezvoltare, să nu prezinte afecțiuni ale organelor vitale sau leziuni vizibile, femelele să nu fie gestante etc.

Metoda gavajul este metoda aleasă pentru administrarea compușilor salini și anume clorurilor de zinc, respectiv de mangan la șobolani de experiență linia Wistar.

Prima etapă la începutul experimentului pe animalele de experiență a fost formarea grupurilor (loturilor) de animale și anume un grup de control (C) și patru grupuri experimentale (E_i). În fiecare lot au fost alese 10 animale – șobolani linia Wistar, de sex feminin și masculin, așezate însă în cuști speciale separat șobolanii femele de șobolanii masculi pentru a nu avea în grupele de lucru animale gestante.

După alegerea animalelor și formarea grupurilor experimentale s-a trecut la marcarea tuturor animalelor din toate cinci grupurile de control și experimentale. Pentru aceasta s-a recurs la marcarea prin realizarea unei tăieturi în formă de V a urechilor animalelor. Nu s-a procedat la marcarea animalelor cu substanțe chimice (vopsea, carioca) deoarece acestea pot conține urme sau chiar cantități importante de elemente metalice sau alte substanțe care ar putea influența rezultatele finale (e.g.: conținutul în anumite elemente metalice determinate din anumite organe, mușchi sau rezultatele analitice din probele sanguine). De asemenea, șobolanii în timpul în care își fac toaleta pielii „transferă” aceste substanțe (e.g.: coloranți) și ca atare însemnul realizat dispare, animalul nemaiputând fi indentificat ulterior.

Animalele au fost lăsate un timp de trei zile după formarea grupurilor pentru acomodare și pentru uniformizare din punct de vedere al alimentației și al condițiilor de mediu (temperatura aerului, umiditatea relativă a aerului, ventilația încăperii, luminozitatea, eventualele zgomote, microflora, precum și factorii chimici ai microclimatului – componentele gazoase ale aerului).

La începutul experimentului animalele au fost cântărite pentru a putea avea un control și din punct de vedere al statusului ponderal pe parcursul experimentului și pentru a observa eventualele modificări de greutate care pot fi datorate substanțelor administrate pe parcursul experimentului.

În a 4-a zi de la începerea experimentului s-a realizat prima administrare a compușilor salini studiați prin gavaj, cloruri de zinc și mangan, iar în a 7-a zi a doua

administrare prin gavaj (fig. 4-1). Sacrificarea animalelor pentru recoltarea de probe biologice (sânge și organe) s-a realizat în ziua a 14-a de experiment.



Fig. 4-1. Modul de administrare prin gavaj a compușilor studiați la șobolani linia Wistar

Înainte de realizarea propriu-zisă a gavajului s-a recurs la o anestezie prealabilă a animalului pentru ca acesta să poată fi controlat mai ușor pe parcursul administrării soluțiilor. Substanța utilizată ca și anestezic a fost Ketamina (soluție la care 1 ml ketamina reprezintă 40 UI de anestezic). Denumirea comercială a anestezicului folosit a fost "Calypsol" (flacon de 10 ml Calypsol cu 500 mg clorhidrat de ketamina) produs de firma "Gedeon Richter Ltd.", Budapesta – Ungaria, cu o concentrație de 50 mg / ml ketamina și cu administrare injectabilă intramuscular (i.m.) sau intravenos (i.v.). Pentru fiecare animal s-a calculat cantitatea de anestezic administrată, astfel că s-a folosit o soluție ketamina 50mg / ml astfel încât 1ml (40 UI) din anestezic administrat să corespundă la 125g greutate corporală.

Narcoza animalelor de experiență a început în 10-15 minute de la administrarea anestezicului și a durat cca. 1 oră. Administrarea ketaminei s-a făcut cu seringi de unică folosință gradate în mililitri și UI, având un volum maxim de administrare de 1 ml. După administrarea anestezicului s-a procedat la administrarea soluției prin gavaj direct în stomac.

Pentru realizarea acestei intervenții s-a ales o sondă din plastic specială (tip utilizat în serviciile de anestezie – reanimare) pentru astfel de investigații, care avea închisă extremitatea terminală a sondei (spre a nu produce leziuni mecanice). Această sondă a fost introdusă până în stomac. Foarte aproape de extremitatea terminală a sondei exista cu un orificiu lateral, care permitea trecerea soluției din sondă în stomac. La celălalt capăt sonda avea un dispozitiv care permitea fixarea unei seringi cu care se putea administra un volum exact de soluție. Diametrul sondei utilizate era de cca 3 mm și se preta pentru intervenții de acest fel pe șobolani linia Wistar, fără a pune în pericol starea de sănătate a animalului.

Pentru administrarea unui anumit volum de soluție sonda s-a spălat cu soluție de administrat după care s-a umplut cu aceeași soluție de administrat și s-a procedat la eliminarea bulelor de aer din sondă. Apoi s-a procedat la introducerea sondei prin cavitatea bucală a șobolanului anesteziat, apoi prin esofag până în stomac, încet și fără a forța, iar în cazul în care la intrare sonda a întâlnit vreun obstacol s-a retras puțin și s-a încercat încă o dată introducerea acesteia. Când sonda a ajuns în somac s-a procedat la administrarea lentă a volumului exact de soluție conform protocolului experimental.

După administrarea soluției, sonda s-a retras lent din stomac și animalul a fost repus în cușca sa, dar s-a făcut urmărirea comportamentului acestuia și felului în care animalul și-a revenit din anestezie.

Administrarea soluțiilor de lucru s-a făcut în a 4-a și a 7-a zi de la începerea experimentului, la grupul de control (C) administrându-se apă potabilă. La grupurile experimentale E_1 și E_2 s-au administrat soluții de coloră de mangan în concentrații diferite, iar la grupurile experimentale E_3 și E_4 s-a administrat soluții de clorură de zinc. În a 14-a zi animalele au fost sacrificate în vederea prelevării de probe pentru analiză. Pe tot parcursul experimentului animalele au fost supravegheate și s-a urmărit comportamentul acestora, atât din punct de vedere al consumului de apă și hrană, cât și din punct de vedere al comportării comparativ cu ceilalți șobolani.

În ultima zi a experimentului (ziua 14) animalele au fost cântărite pentru a se observa dacă există diferențe semnificative între greutatea corporală a animalelor la începutul și la sfârșitul experimentului.

4.2.2. Concentrația metalelor în soluțiile administrate

Pentru administrarea compușilor salini, respectiv a clorurilor, s-a conceput un model experimental în care să se utilizeze clorură de mangan și clorură de zinc, în două concentrații diferite. În acest scop s-a luat ca „referență” așa numita doză zilnică recomandată (Recommandation Daily Intake) – noțiune utilizată în nutriție, fiziologie, biochimia alimentară prin abrevierea RDI. În investigațiile efectuate s-au utilizat concentrații reprezentând concentrația dublă a RDI – deci $RDI \times 2$ și respectiv concentrația avadruplă – deci $RDI \times 4$.

Pentru a stabili, în cadrul protocolului experimental, doza sau concentrația de mangan, respectiv zinc, care se dorește a fi administrată s-a recurs la consultarea mai multor tratate și lucrări de specialitate. S-au urmărit în mod special recomandările referitoare la necesarul și excesul de mangan pentru organismul uman. Astfel, s-a luat ca referință pentru acest studiu un necesar de 12-15 mg / zi mangan (Derek, 1995; Dinu et al., 1996; Mogoș, 1997; Expert Group on Vitamins and Minerals Meeting – Nutrition Unit A, JFSSG MAFF – Review of Manganese, 2002). Deoarece prin aceste experimente pe animale de laborator s-a avut în vedere punerea în evidență a unor modificări biochimice în organism prin administrarea unor doze de biometale mult crescute față de necesarul zilnic s-a luat ca referință valoarea maximă recomandată pentru mangan, respectiv 15 mg / zi. În acest context, dacă doza recomandată a fost de 15 mg mangan / 70 Kg, aceasta reprezintă 0,214 mg mangan / Kg corp per zi.

În mod analog s-a procedat și în cazul zincului. Pentru aceste experimente s-a luat ca referință un necesar de 12-15 mg / zi zinc (Derek, 1995; Dinu et al., 1996; Mogoș, 1997; Expert Group on Vitamins and Minerals Meeting – Nutrition Unit A, JFSSG MAFF – Review of Manganese, 2002). Urmărindu-se efectele administrării unor doze de zinc mai mari decât cele recomandate s-a luat în studiu necesarul de 15 mg / zi zinc, ceea ce reprezintă 0,214 mg zinc / Kg corp per zi.

Concentrația soluției de clorură de mangan administrată animalelor din grupul experimental E_1 a fost dublul dozei recomandate de mangan pentru organismul uman ($RDI \times 2$) și anume 1,550 mMol/L $MnCl_2$, iar concentrația soluției de clorură de mangan administrată animalelor din grupul experimental E_2 a fost cvadruplul dozei recomandate de mangan pentru organismul uman ($RDI \times 4$), respectiv 3,110 mMol/L $MnCl_2$.

În cazul concentrației soluțiilor de clorură de zinc, concentrația soluției administrată șobolanilor din grupul experimental E_3 a fost dublul dozei recomandate de

zinc pentru organismul uman (RDI x 2) și anume 1,316mMol/L ZnCl₂, iar concentrația soluției de clorură de zinc administrată animalelor din grupul experimental E₄ a fost cvadruplul dozei recomandate de zinc pentru organismul uman (RDI x 4), respectiv 2,633 mMol/L ZnCl₂.

De asemenea, pentru alegerea tipului de sare de mangan și zinc care a fost administrată șobolanilor de experiență Wistar s-au avut în vedere mai multe aspecte legate de o eventuală toxicitate a sării respective, dar și alte criterii de apreciere. S-a ales ca sare de administrare clorurile de mangan și zinc și pentru faptul că s-a procedat la o administrare orală, prin gavaj, direct în stomacul animalelor. În acest sens se știe că sucii gastrici din stomac are în compoziție acid clorhidric care determină un pH foarte acid. Pe lângă aceste aspecte, s-a avut în vedere faptul că sărurile acidului clorhidric (clorurile) sunt, în general, mult mai solubile în mediul apos comparativ cu alți compuși, e.g.: clorura de mangan este mult mai solubilă decât dioxidul de mangan (Comoroșan, 1964).

Intoxicarea accidentală cu zinc poate apare ca urmare a utilizării terapeutice ca suplimente alimentare cu zinc, e.g.: sulfat de zinc mai mult de 6,47 mg / Kg corp / zi timp de o săptămână (Moore, 1978). Nutriționiștii constată o posibilă intoxicație accidentală cu zinc și prin consumarea alimentelor contaminate cu compuși ai zincului datorită păstrării alimentelor în ambalaje galvanizate cu zinc. Cei mai toxici compuși ai zincului sunt compușii anorganici folosiți la prepararea unor rodenticide și care pot duce la comă și chiar moarte în câteva zile sau săptămâni de la ingestie, doza letală fiind estimată la 40 mg / Kg corp (Mack, 1989).

În cazul organismului uman, zincul metalic are doza de referință (RfD) pentru toxicitatea cronică în cazul ingestiei orale de 0,2 mg/kg corp/zi (U.S. EPA, 1992). Pe baza studiilor clinice s-a demonstrat că zincul în exces induce deficiența de cupru (deci zincul este antagonist pentru cupru) și anemie la pacienții care fac tratament cu sulfat de zinc (utilizat ca medicație pentru tratamentul anemiei falciforme (U.S. EPA, 1992). Oficiul pentru Administrarea apei potabile din SUA recunoaște ca doză de referință pentru toxicitatea cronică a zincului, în ingestia orală, o doză de 0,2mg/kg corp/zi (U.S. EPA, 1991).

De asemenea, forma chimică în care se află manganul sau compușii acestuia influențează absorbția și implicit toxicitatea la nivel de organism uman sau animal. Astfel în urma unor studii experimentale s-a demonstrat că administrarea la șobolani de clorură de mangan (MnCl₂) în concentrație de 24,3 mg Mn / Kg corp / zi prin gavaj, o singură dată pe săptămână timp de patru săptămâni a dus la creșterea cu 68% a nivelului de mangan din sânge (Roels et al., 1997) și la creșterea cu 22% a nivelului de mangan din cortex dar nu și în cerebel și corpii striati.

Pe de altă parte aceeași doză de mangan sub formă de dioxid de mangan (MnO₂), administrată oral, nu a determinat creșterea concentrației de mangan în sânge sau țesutul cerebral. Concentrația de mangan la nivelul ficatului nu a fost influențată de nici una din formele de mangan (Expert Group on Vitamins and Minerals Meeting – Nutrition Unit A, JFSSG MAFF – Review of Manganese, 2002).

Datele din literatura de specialitate cu privire la toxicitatea compușilor de zinc și mangan au făcut ca, sarea aleasă pentru experimentele pe animale de laborator – șobolani linia Wistar – să fie clorură de zinc, respectiv clorură de mangan.

După alegerea tipului de sare – clorură de mangan, respectiv clorură de zinc – s-a procedat la calcularea concentrației soluțiilor care urmau a fi administrate animalelor de experiență. Astfel s-au avut în vedere mai multe aspecte legate de caracteristicile animalelor pe care s-a lucrat precum și de concentrația metalului pe care dorim să-l administrăm.

În acest sens, s-a pornit de la faptul că prin gavaj, la șobolani adulți linia Wistar se recomandă să se administreze cantități nu prea mari de lichide. Pentru acest fapt s-a luat în considerare că greutatea animalelor de experiență pe care s-a lucrat a fost în medie de 100g. De asemenea, s-a calculat cât este concentrația dozei recomandate de mangan, respectiv de zinc pentru o zi per Kg corp pentru organismul uman. S-au făcut calculele pentru a obține o soluție care în 1 ml să conțină concentrația de oligoelement (mangan, respectiv de zinc) dublul sau cvadruplul RDI pentru 100 g greutate corporală a animalelor de experiență. În acest sens se prezintă câteva date fizico-chimice caracteristice ale clorurii de mangan utilizate în experimentul de față preluate din Manualul Inginerului Chimist (1972) – Tabel 4-1.

Tabel 4-1. Constante și date fizico-chimice și tehnice pentru clorura de mangan – $MnCl_2 \times 4 H_2O$

Caracteristici fizico-chimice pentru $MnCl_2 \times 4 H_2O$		
Masa moleculară (Da)	197,91	
Culoarea	Roz	
Densitatea (g / cm ³)	2,01 ²⁵	
Punct de topire (°C)	58: - H ₂ O, 106	
Punct de fierbere (°C)	- H ₂ O, 198	
Forma cristalină	Delicată	
Solubilitate (g substanță la 100 ml soluție)	În apă rece	151 / 8
	În apă caldă	656 / 100

Pentru clorura de zinc utilizată în cadrul acestui experiment se prezintă câteva date fizico-chimice caracteristice în tabelul 4-2, preluate după Manualul Inginerului Chimist, 1972.

Tabel 4-2. Constante și date fizico-chimice și tehnice pentru clorura de zinc – $ZnCl_2$

Caracteristici fizico-chimice pentru $ZnCl_2$		
Masa moleculară (Da)	136,28	
Culoarea	Albă	
Densitatea (g / cm ³)	2,91 ²⁵	
Punct de topire (°C)	262	
Punct de fierbere (°C)	732	
Forma cristalină, caracteristici generale, indice de refracție	Cubică, delicată	
Solubilitate (g substanță la 100 ml soluție)	În apă rece	432 / 25
	În apă caldă	615 / 100

După prepararea soluțiilor s-a pregătit sonda de gavaj și o seringă gradată, care s-a cuplat la sondă și cu care am administrat cantitatea de soluție prevăzută în protocolul

experimental pentru fiecare animal (de precizat că animalele au fost cântărite inițial, iar după aceea s-a stabilit concret ce volum de soluție se administrează).

Imediat după fiecare administrare animalele au fost urmărite din punct de vedere al comportamentului și nu s-au înregistrat fenomene deosebite.

4.2.3. Prelevarea de probe și determinările biochimice

Procedura experimentală instituită a avut ca efect urmărirea efectelor produse de administrarea sărurilor de mangan și zinc, respectiv a clorurilor de mangan și zinc în concentrații care depășesc doza zilnică recomandată (Recommendation Daily Intake – RDI) la animale de experiență – șobolani linia Wistar. Un al doilea efect urmărit a fost legat de timpul de acțiune și de aceea soluțiile testate s-au administrat în ziua a 4-a și a 7-a, iar sacrificarea animalelor s-a făcut în ziua a 14-a.

Probele prelevate în ziua a 14-a a experimentului au fost probe de sânge și excizate de organe. Sângele s-a recoltat după o prealabilă anestezie cu ketamina. După anestezie s-a procedat la laparotomie (deschiderea cavității abdominale) – fig. 4-2.



Fig. 4-2. Laparotomia realizată la șobolani linia Wistar pentru recoltarea probelor de rinichi

Recoltarea s-a realizat cu seringi de unică folosință și sângele prelevat a fost transvazat în eprubete sterile etichetate. Eprubetele cu sângele de analizat au fost imediat centrifugate. S-a lucrat cu atenție și s-a evitat hemolizarea probelor deoarece serul hemolizat nu poate fi introdus la analizoare performante pentru determinări analitice. Astfel rezultatele pot fi compromise. În urma centrifugării s-a urmărit separarea serului sanguin de plasmă, deoarece în determinările analitice realizate s-a folosit serul sanguin. Prelevarea serului centrifugat din eprubete s-a făcut cu ajutorul unor pipete automate.

Probele de sânge au fost investigate cu un analizor automat tipul “Dimension”, produs de firma “Dupont” – care funcționează pe principiul unui spectrofotometru UV / VIS. Acest aparat permite determinarea unui număr de 19 parametrii biochimici din ser sanguin din clase diferite de compuși: glucide; lipide; electroliți; enzime și compuși azotați neproteici sanguini.

Pentru a putea observa dacă există variații ale concentrației proteinelor totale și fracțiunilor proteice sanguine, din probele de sânge prelevate de la șobolani din grupul

de control (grupul C) și grupele experimentale (E_i) s-a separat serul sanguin. Apoi, din serul sanguin s-au făcut determinări de proteine totale cu Refractometrul Abbé, când s-au determinat grame de proteine totale per dL ser sanguin.

Determinările de albumine serice s-au făcut prin citirea extincției probelor și a standardului, după care s-a aplicat formula de calcul:

$$\text{Albumine serice} = \frac{E_p}{E_e} \cdot 5 \text{ [g / dL]}$$

unde: E_p – extincția probei;
 E_e – extincția etalonului.

Astfel, raportul extincției probei la extincția etalonului înmulțit cu 5 a permis calcularea cantității de albumine (exprimate în grame albumine / dL ser sanguin).

În vederea recoltării probelor de sânge, după efectuarea anesteziei și a laparatomiei s-a procedat la îndepărtarea organelor și prelevarea de sânge direct din vena caudală (fig. 4-3) cu seringi sterile de unică folosință.

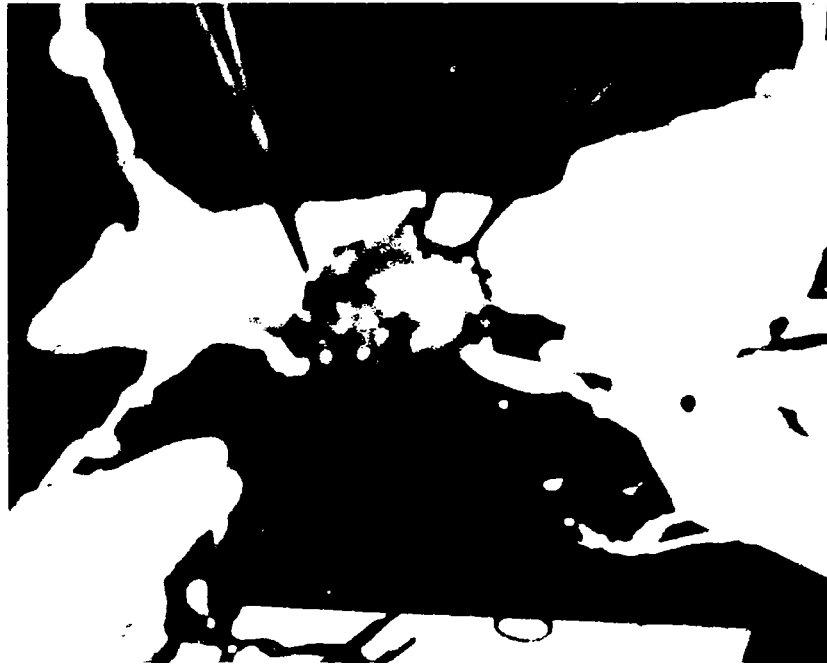


Fig. 4-3. Prelevarea de sânge din vena caudală de la șobolani linia Wistar

Aparatul cu care s-au făcut citirile extincțiilor pentru calcularea concentrațiilor de albumine a fost “Specol”, iar citirile extincțiilor s-au făcut la o lungime de undă de 628 nm.

Analizele clinice de laborator pentru sânge au urmărit concentrația unor metaboliți glucidici (glucoza); lipidici (trigliceride, colesterol) și protidici (proteine totale, albumine și globuline).

De asemenea, s-au făcut determinări cantitative și de unele enzime sanguine, dintre care: α -amilaza; transaminaza ALT – alanil-amino-transferaza sau GPT – glutamat-piruvat transaminaza și transaminaza AST – asparagin-amino-transaminaza sau GOT – glutamat-oxalat transaminaza; fosfataza alcalină.

Datorită faptului că studiul de față a presupus administrarea unor substanțe minerale în doze care au depășit aportul recomandat, s-a procedat și la determinarea cantumului unor electroliți sanguini. Bioelementele investigate au fost: sodiul, potasiul, calciul, magneziul și fierul.

Eliminarea excesului de substanțe care acced în organism se face pe diverse căi: tractul digestiv (prin fecale), tractul reno-urinar (prin urină). Din aceste motive s-a realizat și determinarea cantitativă a unor compuși azotați neproteici, dintre care: acid uric, creatinină, azot ureic și bilirubină totală.

Imediat după recoltarea probelor de sânge a început recoltarea de organe – respectiv prelevarea de rinichi. Recoltarea acestora s-a făcut cu instrumentar seteril și cu lame de bisturiu bine ascuțite pentru a putea recolta doar rinichiul care prezenta interes pentru acest studiu.

Toate probele recoltate au fost imediat puse în sticle cu dop (în prealabil spălate și uscate), care au fost etichetate. Pe etichete s-au înscris date referitoare la numărul animalului de la care s-a recoltat proba respectivă, codul lotului, data recoltării și greutatea probei recoltate. Probele s-au conservat apoi în congelator la temperaturi cuprinse între -18°C și -20°C . Ulterior, în scop analitic acestea au fost supuse calcinării în vederea determinărilor cu spectrofotometrul de absorbție atomică.

Pentru investigații s-au utilizat un spectrofotometrul de absorbție atomică de tipul "Analyst 100" produs de firma Perkin Elmer. Calcinarea s-a făcut cu un cuptor de calcinare Nabertherm.

În analizele biochimice, datele despre oligoelemente oferă un interes limitat în ceea ce privește exactitatea analitică intrinsecă și din acest motiv multe dintre determinări sunt privite cu septicism. Uneori există date analitice vizibil contradictorii și aceasta din cauza limitelor tehnice ale metodelor utilizate, neluarea în considerare a tuturor cauzelor de eroare sau chiar insuficienta pregătire a personalului de a efectua astfel de determinări.

Urmărind, în cadrul acestei lucrări, dozarea unor biometale și metale cu potențial toxicogen s-au avut în vedere unul dintre principalele surse de erori care intervin în determinările de cantitative de elemente minerale:

- prelevarea în condiții necorespunzătoare, în locații improprii, cu instrumente care pot contamina probele biologice. Astfel, sunt recomandate instrumentele adecvate. Contaminanții aeropurtați nu sunt de neglijat nici aceștia (aluminiu, crom, plumb, mangan etc.).
- durata conservării probelor înaintea analizei chimice. Stabilitatea unui constituent chimic în cursul perioadei de conservare depinde de tipul de matrice în care se află oligoelementul. Conservarea criogenă este o metodă clasică care permite păstrarea într-o măsură mai mare a identității chimice a probei. Pentru determinarea ulterioară a elementelor în urme, recipientii trebuie să prezinte garanții de securitate, noncontaminare și non-degradare (e.g.: flacoane de polietilenă).
- pierderi de oligoelemente în cursul analizei prin degajare gazoasă, absorbție, adsorbția de țesut pe pereții recipientului de calcinare, expandarea țesutului supus calcinării în afara recipientului datorită nerespectării unui prag progresiv de temperatură care ar permite creșterea temperaturii gradual, precum și formarea de aerosoli. În cazul materialelor biologice aceste fenomene apar în fazele de

incinerare, uscare sau evaporare. Pe parcursul acestor faze, volatilitatea unui element depinde de forma chimică în care se află proba.

- solubilierea cenușii obținute în urma calcinării probei nu are, în general, riscuri foarte mari. Acest fapt depinde totuși de procedura aleasă, și anume, în „sistem deschis” (mineralizarea cenușii obținute prin calcinare) sau în “sistem închis” (mineralizarea în cuptor cu microunde). În prezența unui mediu concentrat în cloruri se pot pierde prin volatilizare compuși de tipul: AsCl_3 , SbCl_3 , SeCl_5 , GeCl_4 , HgCl_2 . Se poate produce pierderea de oligoelemente nevolatile prin incompleta dizolvare a cenușii. Un mediu cu sulfuri determină eliminarea cuprului și mercurului sub formă de sulfură de cupru și sulfură de mercur.

Probele supuse analizei spectrofotometrice au fost reprezentate de țesut umed recoltat de la șobolani linia Wistar. Acestea au fost cântărite cu o balanță de tip Mettler-Toledo cu o precizie de 0,0001 g și puse în creuzete de porțelan. Cuptorul de calcinare a fost reglat la un program de temperatură riguros stabilit și anume: probele să fie calcinate la temperatura de 100°C timp de 120 minute (2 ore), apoi se ridică temperatura la 200°C timp de 240 minute (4 ore), după care se ridică temperatura încă un prag la 450°C timp de 1080 minute (18 ore). Temperatura din cuptor a fost ridicată treptat pentru a evita expandarea țesutului pe parcursul deshidratării și calcinării probei. Astfel s-a încercat evitarea pierderii unor cantități de țesut în spațiul cuptorului, dar și evitarea pierderilor de metale cu volatilitate mare (la temperaturi de peste 450°C).

Am decis alegerea unui prag inițial de temperatură pentru calcinarea în trepte, cu o paliere lentă de temperatură până la 150°C, care să nu producă o evaporare bruscă a apei și eliminarea rapidă a gazelor din probă, ceea ce ar fi dus la expandarea probei (țesutului) și pierderea de analit în mediul cuptorului de calcinare. În final temperatura de calcinare a fost aleasă a fi 450±25° C pentru a micșora pierderea de analit prin volatilizare. În cazul în care, după calcinare cenușa prezenta “puncte negre” (urme de substanțe organice neoxidate), aceasta s-a reluat cu acid clorhidric și s-a dizolvat pe baie de nisip până la dispariția “punctelor negre”. Pentru că nu am avut la dispoziție etaloane care să reproducă matricea fiecărui organ în parte, iar conținutul de acid al probelor a fost reprodus și la etaloane. Probele de țesut inițial s-au cântărit astfel încât să se poată dilua soluțiile de lucru pentru analiză, aceasta fiind o metodă de reducere a interferențelor metricei. De asemenea, s-a efectuat controlul calibrării stabilindu-se domeniul de precizie al citirii pentru fiecare element determinat.

După calcinare probele au fost răcite la o temperatură care să permită scoaterea creuzetelor din calcinator. Cenușa care a nu a fost albă și a avut “puncte” negre datorită calcinării incomplete (la 450°C cenușa are culoare albă) a fost tratată cu o soluție de acid azotic : apă 1:1, în volum de 5 ml pentru fiecare creuzet cu o pipetă, prin spalarea pereților creuzetului. Creuzetele au fost puse pe o baie de nisip sub nișă pentru evaporarea lentă a acidului până aproape de sec. S-a reluat cu acid azotic 5%, s-a filtrat pe hârtie de filtru după o prealabilă spălare a acesteia cu apă fierbinte. Filtratul s-a colectat apoi în balon cotat de 50 ml, aceasta reprezentând soluția de lucru.

Pentru analiza zincului din soluția de lucru s-a folosit atomizarea în flacără de aer-acetilenă și ulterior s-a făcut analiza prin absorbție atomică a acestui metal. Pentru determinarea cuprului, cromului, aluminiului, manganului și plumbului atomizarea s-a făcut în cuptor de grafit în curent de argon. După trasarea curbelor de etalonare cu

concentrații care să se încadreze în domeniul liniar al curbei s-au citit absorbanțele probelor, aria picurilor rezultate fiind o măsură a concentrației de metal din soluție. Soluția de lucru a fost diluată în funcție la nevoie, astfel încât concentrația decelată să fie aproximativ la mijlocul domeniului de măsurare.

4.2.4. Calculul statistic al rezultatelor obținute

În urma unor determinări fizico-chimice sau în urma unor teste de laborator se obțin rezultate analitice. Aceste date vor permite ulterior să se facă aprecieri asupra metodei aplicate și asupra importanței studiului realizat.

Efectuarea unor analize de laborator presupune urmarea unui anumit model experimental, executat după un protocol bine stabilit.

De asemenea, pentru exprimarea rezultatelor trebuie să se aibă în vedere și posibilitățile existenței unor erori, cărora trebuie să li se acorde o atenție deosebită. Astfel, în urma obținerii rezultatului final trebuie să se vadă dacă acest rezultat este acceptabil și mai ales sigur. Orice mărime fizică măsurată este susceptibilă de un anumit grad de incertitudine. Modificarea protocolului experimental și utilizarea unei alte aparaturi pentru efectuarea măsurătorilor pot determina variații ale gradului de incertitudine.

Pentru a obține, un rezultat sigur și în general date de acuratețe (Pietrzyk și Frank, 1989), trebuie să avem în vedere următorii factori subiectivi:

- la utilizarea instrumentelor de măsură, ultima cifră a măsurătorilor se estimează prin cea mai mică diviziune a aparatului de măsură folosit;
- în mod obișnuit, se execută un număr de determinări și se ia o medie aritmetică a acestora. Dacă este cazul conform unor teste specifice se vor îndepărta rezultatele (vor fi excluse) considerate nesigure sau incerte;
- experimentările de diverse tipuri, au grade de incertitudine diferite astfel că la eveluarea valorii finale se calculează o medie aritmetică a valorilor separate, cu precizarea că se au în vedere doar valorile considerate precise;
- pentru efectuarea unor determinări – măsurători și pentru calcularea rezultatelor există reguli sau expresii matematice, dar trebuie să se țină seama de faptul că acestea sunt subiective, fiind bazate pe presupuneri arbitrare și astfel sunt influențate de opinii personale.

Calculul statistic al rezultatelor presupune, așa cum s-a prezentat și anterior, obținerea rezultatelor analitice după care acestea se prelucrează statistic respectând anumite criterii specifice chimiei analitice cu scopul obținerii de rezultate de înaltă acuratețe.

4.3. Investigarea unor metaboliți sanguini în relație cu administrarea de compuși metalici

În analitica biochimică este vizat și domeniul electroliților, și ca atare, numeroase studii și cercetări urmăresc acțiunea unor metale sau variații ale cantumului de metale (în organismul uman sau animal), când se administrează diverse alte substanțe în scopul testării. Se cunoaște faptul că testele fizice, fizico-chimice, microbiologice sunt urmate, obligatoriu, de teste biochimice și toxicologice pe animale

de laborator. Unul din testele obligatorii – atât în cazul alimentelor, cosmeticelor, produselor farmaceutice – cât și al ambalajelor, este testul de investigare calitativă și cantitativă a metalelor.

Cuantumul metalelor prezente în diverse produse alimentare influențează în mod direct sau indirect starea de sănătate a persoanelor care vin în contact cu acele produse. În general, produsele – indiferent de originea acestora – conțin pe lângă produși glucidici, lipidici și protidici și elemente de origine mineral, atât cationi cât și anioni. De asemenea, cuantumul acestor elemente variază foarte mult în funcție de origine; de materia primă și auxiliară din care este fabricat; de tehnica și metoda de procesare; de locul în care este produs și depozitat ș.a. Anumite metale și nemetale sunt tolerate de organismul uman în limite foarte mari, dar cu toate acestea, și pentru acestea există limite maxime de concentrație. Totuși, multe dintre elementele metalice sunt indispensabile pentru dezvoltarea normală, în limite optime a organismelor vii.

Studiile de specialitate au arătat faptul că pentru a omologa un anumit produs farmaceutic sau alimentar, este necesară efectuarea unor teste de laborator pe animale de experiență. Pe baza rezultatelor obținute la toate examenele (fizice, fizico-chimice, microbiologice, biochimice și toxicologice) se poate certifica dacă acel produs se poate folosi sau nu. Dacă rezultatele de laborator se încadrează în limitele legale produsul poate fi comercializat. Se precizează dacă sunt stabilite limite sau cazuri în care există restricții – e.g.: la unele produse farmaceutice sau chiar la anumite suplimente alimentare există posibilitatea ca în timpul unor tratamente pe bază de electroliți, elementul pentru care există o carență în organism să producă intoxicații datorită nerespectării recomandărilor caracteristice produsului respectiv.

Clasificarea elementelor minerale se poate face după două criterii: unul fiind necesarul acestora în organismul uman și al doilea fiind modul de acțiune al acestora asupra organismului (fig. 4-4).

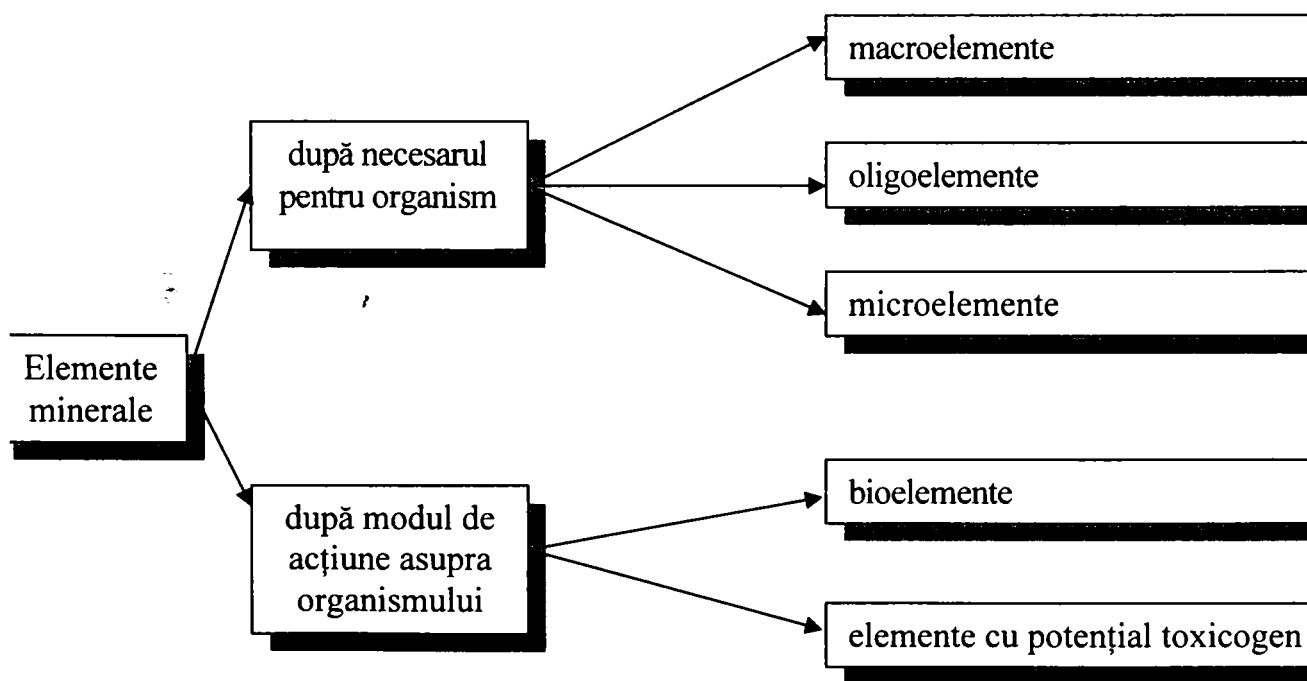


Fig. 4-4. Clasificarea generală a elementelor minerale

Lucrarea de față și-a propus să trateze doar problema legată de prezența oligoelementelor metalice (deci cationice) și efectul acestora asupra organismului. În acest sens s-a avut în vedere clasificarea oligoelementelor redată de către Anke și Groppe (1987), în care sunt prezentate două grupe de oligoelemente: clasice – Fe, Cu, Mn, Zn, Co, Mo, Cr, Se, I, F) și oligoelemente recent recunoscute ca necesare pentru organismul uman (“new trace elements”) – V, Ni, Li, Si.

Trebuie precizat faptul că în urma studiilor efectuate în acest domeniu, s-a enunțat un principiu general valabil, și anume că nici un element chimic nu este toxic, ci totul depinde de doza administrată. Deci și compușii minerali necesari organismului uman sau animal, în anumite situații pot deveni toxici. Acesta este și motivul pentru care s-a optat pentru un astfel de studiu, și trebuie recunoscut faptul că aceste cercetări vizează și problema majoră a începutului de mileniu III – problema poluării tot mai accentuate a tuturor zonelor de pe întreg globul.

Investigațiile de laborator pe animale de experiență presupun instituirea unui model experimental și a unui protocol de lucru. Acestea este necesar să se stabilească cu certitudine și pe baza unor criterii bine definite. Astfel, se impune cunoașterea compusului sau substanței pe care dorim să o testăm, a limitelor homeostazice și corelarea cu anumiți parametri fizico-chimici și biochimici. Acest fapt impune consultarea unei vaste bibliografii în acest domeniu, dar și compararea datelor referitoare la experimentul propriu-zis cu condițiile de lucru, care pot fi asigurate la locul experimentului propriu (climă, alimentație, specie de animal, rasă, sex, stare fiziologică, grad de maturitate etc.).

Interacția produsă între metale și acizii nucleici îndeosebi acidul deoxyribonucleic (DNA) influențează prioritar sinteza proteică fapt intens studiat în biologia moleculară (Alberts et al., 1983; Kaplan și Pesce, 1984; Kaplan și Delpech, 1990).

Efectele induse asupra sintezei proteice contribuie la modificări ale homeostaziei diverșilor metaboliți.

În continuare se prezintă câteva aspecte referitoare la interacția dintre ionii metalici divalenți (M^{2+}) și DNA.

Metalele penetrează astfel membrana celulară și membrana nucleară, ajungând până la acizii nucleici, intrând în interacție cu acesta (Sissoeff et al., 1976).

Acidul deoxyribonucleic este o macromoleculă poliheteronucleotidă formată prin alipirea unui atom de C_3 între un grup a unei deoxyribonucleotidă și un atom de C_5 la deoxyribonucleotida adiacentă. Această alipire este caracteristică structurii de bază.

În acest context aducții de tip DNA — Mg^{2+} , cu participarea ionilor metalici alcalino-teroși (Ca^{2+} , Mg^{2+}) și a unor ioni metalici tranziționali (Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} etc.) este discutabilă. În jurul acestei discuții s-au făcut observații speciale mai ales asupra particularităților aducțiilor de tip DNA- Mg^{2+} (Gârban, 1996).

Structurile rezultate au fost studiate prin variate metode fizico-chimice, de exemplu spectroscopice de absorbție, rezonanțe nucleare și magnetice, dicroism circular (CD), distorsiune optică rotatorie (ORD) etc. Investigațiile realizate prin CD asupra unor sisteme DNA/ Mg^{2+} au relevat modificări în structura secundară a structurii de tip B-DNA (forma nativă).

Referitor la structurile DNA- M^{2+} , putem concluziona că ionii de Mg^{2+} și Ca^{2+} chelează la nivelul grupărilor fosfodiesterice, în timp ce ionii metalici divalenți chelatează la nivelul nucleobazelor intrahelicale. În cazul ionilor de Zn^{2+} și Mn^{2+} se desfășoară concomitent o chelatare a grupărilor fosfodiesterice și a nucleobazelor.

Macromolecula cu configurația coaxială dublu helix, definind structura secundară, conține perechile de bază: adenină-timină (A-T) și guanină-citosină (G-C), prezentate în figura 4-5.

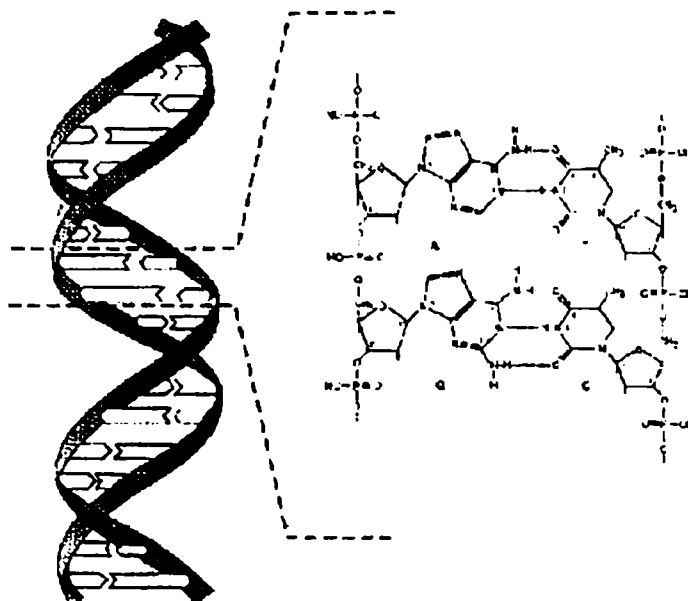


Fig. 4-5. Macromolecula de DNA cu perechile de baze azotate aferente (Gârban, 2001)

Biomoleculele de DNA pot interacționa cu ionii metalici divalenți (M^{2+}) și generează aducți cu structuri de DNA- M^{2+} . Astfel, relația între structura chimică și activitatea biologică este modificată. Chelatarea ionilor metalici este determinată pe măsură ce grupurile fosfodiesterice ale lanțurilor de DNA se leagă între ele sau cu nucleobazele, în acest caz legăturile putând fi interhelicale sau intrahelicale.

Remarcabil este faptul că Mg^{2+} intervine în biosinteza DNA în mod natural (în vivo), uneori utilizând-se sinteza DNA în vitro. Interacțiunea DNA cu M^{2+} relevă particularitățile chelatizării grupurilor fosfodiesterice. În acest caz M^{2+} stabilizează dublul helix, ca un fapt important atât pentru fiziologie cât și pentru farmacoterapia bazată pe componente de magneziu.

În cazul unor sisteme de tip DNA- Ca^{2+} sau DNA- Mg^{2+} s-a constatat o scădere a ambelor efecte Cotton. Absorbția minimă și maximă a spectrului CD a scăzut și acestea au fost mutate la frecvențe mai mari în concordanță cu creșterea rației molare de Ca^{2+} și Mg^{2+} /DNA.

Aceste descoperiri arată că Mg^{2+} determină tranziția macromoleculelor la structuri de tip C-DNA. Evident, acest proces include întreaga cantitate de B-DNA nativă (naturală) din macromolecula de DNA.

Astfel, pot apărea variate legături specifice aducțiilor (fig. 4-6):

- I. La nivelul grupurilor fosfodiesterice (formele a, b, c);
- II. Între un grup fosfodiestic și guanină;
- III. Între baze complementare de azot (formele a, b, c);
- IV. Între două baze de azot adiacente la nivele diferite;
- V. La diverse poziții în cadrul aceleiași baze purinice (formele a, b);

În sistemele biologice, ionii de magneziu sunt importanți în menținerea integrității și a procesului funcțional a macromoleculelor de DNA.

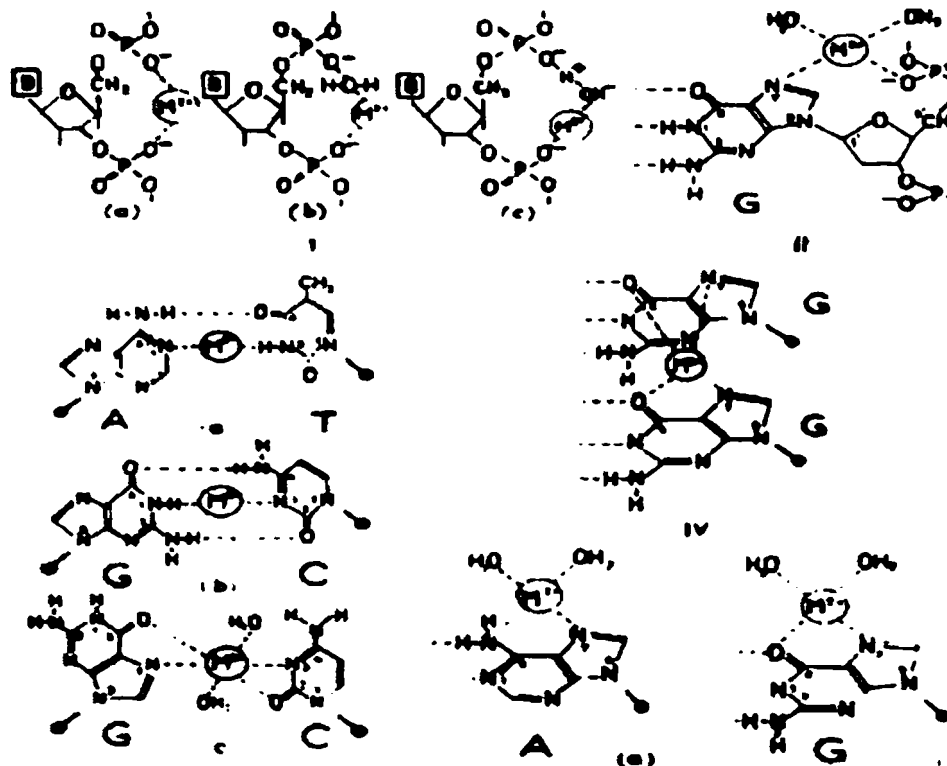


Fig. 4-6. Modele de legare a ionilor metalici divalenți la grupele fosfodiesterice și la nucleobazele DNA (Gârban, 1997)

Concentrația de metale implică valori relativ constante în sistemele biologice, determinate de mecanismele homeostaziei chimice. Ionii metalici sunt prezenți în orice material biologic. Decelarea lor în sistemele biologice pledează pentru existența unor interacțiuni între M^{2+} și DNA.

În urma acestor studii se observă că ionii metalici divalenți (M^{2+}), generează variate tipuri de aducții DNA- M^{2+} . Metalele alcalino-pământoase (magneziu și calciu) chelatează cu grupurile fosfodiesterice, acest proces fiind favorizat de caracterul polianionic al macromoleculii. Astfel, se formează aducții de tip DNA- Mg^{2+} și DNA- Ca^{2+} care la concentrație mare a mediului biologic stabilizează DNA. În general chelatarea ionilor metalici la DNA, în sistemele DNA- M^{2+} , apar la nivelul a doi centrii adiacenți: grupurile fosfodiesterice și nucleobazele.

De asemenea, schimbările survenite în timpul interacțiunii DNA cu ionii metalici divalenți, induc modificări în structura dublu helicală. Astfel, structurile de tip DNA- M^{2+} implică denaturarea relației dintre structura chimică și activitatea biologică a DNA, având importanță în teratogeneză, mutageneză și carcinogeneză.

Investigarea efectelor asupra diverșilor metaboliți după administrarea de compuși chimici cu conținut de oligoelemente metalice implică, de asemenea, modificări ca o consecință a acțiunii asupra acizilor nucleici. Prin interacția DNA cu unele metale este influențată reproducerea celulelor și implicit procesele de biosinteză, în special a proteinelor care se pot repercuta asupra întregului metabolism material.

Așa cum s-a arătat în capitolele precedente, experimentele pe animale sunt influențate de o serie de factori. Alături de aspectele referitoare la condițiile de mediu în care crește și se dezvoltă animalul respectiv, mai trebuie să avem în vedere și aspectele caracteristice substanței de analizat. Astfel, dacă dorim să testăm acțiunea unei substanțe, după administrare – la un anumit interval de timp – se poate face recoltarea probelor (sânge, urină sau alte lichide biologice). Se poate face apoi

determinarea cantitativă a unor metaboliți glucidici, lipidici, protidici și a unor electroliți (toate acestea se pot corela cu cantitatea de substanță administrată, timpul de la administrare sau caracteristicile animalului). Pentru aceasta în capitolele care au fost prezentate și în capitolul care urmează se vor descrie succint modul de acțiune a diverselor metale asupra unor metaboliți.

4.3.1. Efecte induse de mangan asupra unor metaboliți sanguini

Manganul sau compușii acestuia influențează procesul de absorbție la nivel de organism. În vederea punerii în evidență a unor interacții și efecte datorate excesului de mangan s-au făcut unele determinări de metaboliți sanguini. De asemenea, forma chimică în care se face administrarea manganului influențează rezultatele analitice obținute. Având în vedere criteriile de solubilitate și toxicitate a diverselor săruri de mangan asupra organismului uman s-a ales administrarea de mangan sub formă de clorură de mangan ($MnCl_2$).

Pentru a putea observa dacă există variații ale concentrației proteinelor totale și fracțiunilor proteice sanguine, probele de sânge prelevate de la șobolanii din grupul de control (grupul C) și grupurile experimentale (grupul E_1 și E_2) au fost centrifugate. Din serul sanguin s-au făcut determinări de asupra diversilor metaboliți: proteine totale cu fracțiuni albuminice și globulinice, fracțiuni lipidice (trigliceride, colesterol), glucoză etc,

Datele din tabelul 4-3 prezintă concentrația unor parametrii protidici (proteine totale, fracțiuni albuminice și globulinice) a căror determinare s-a făcut din ser sanguin prelevat de la șobolani linia Wistar după administrarea de clorură de mangan în concentrațiile menționate în protocolul experimental pentru grupele experimentale E_1 și E_2 .

Tabel 4-3. Determinarea unor parametrii proteici sanguini după administrare de clorură de mangan

Specificare grup de lucru	Concentrația proteinelor serice (g / dL ser sanguin)					
	n	Proteine totale	n	Albumine	n	Globuline
		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$
Grup C	10	$5,35 \pm 0,42$	10	$3,41 \pm 0,23$	10	$1,94 \pm 0,40$
Grup E_1	10	$5,62 \pm 0,61$	10	$3,74 \pm 0,56$	10	$1,88 \pm 0,59$
ΔX_1		+ 0,27		+ 0,33		- 0,06
Grup E_2	10	$5,67 \pm 0,70$	10	$3,93 \pm 0,46^*$	10	$1,74 \pm 0,11^{**}$
ΔX_2		+ 0,32		+ 0,52		- 0,20

Notă: n – număr animale de experiență; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Se menționează faptul că în tabel se prezintă media concentrației metaboliților sanguini (\bar{X}) și deviația standard (DS). Valoarea ΔX_i reprezintă diferența dintre concentrația medie la grupul de control (\bar{X}_C) și concentrația medie la grupul experimental (\bar{X}_{Ei}), în speță grupurile E_1 și E_2 .

În figura 4-7 se prezintă histograma cu datele din tabelul 4-6, reprezentând concentrația medie a proteinelor serice la grupul de control și grupurile experimentale.

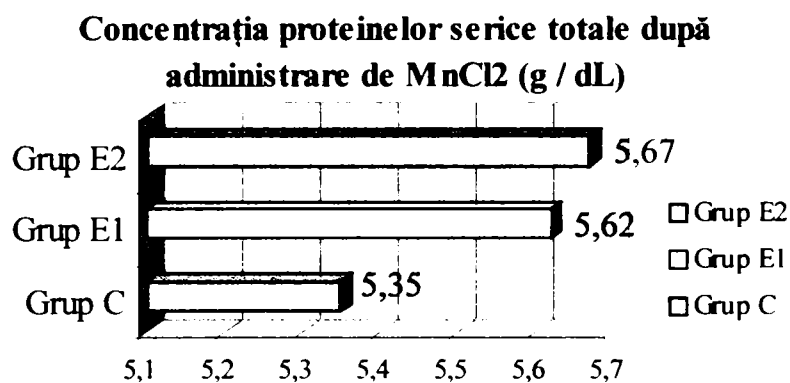


Fig. 4-7. Cuanțumul proteinelor serice după administrarea unei soluții de clorură de mangan

În urma administrării soluției de MnCl₂ în doze mai mari decât cele recomandate (RDI – Recommended Daily Intake) se observă o creștere a concentrației proteinelor serice totale la grupuri experimentale E₁ și E₂ față de grupul de control C. De asemenea, concentrația proteinelor serice totale la grupul experimental E₂ prezintă o creștere față de grupul experimental E₁.

Cu referire la proteine există cercetări care au urmărit evidențierea efectului radioprotectiv al complexilor cu cupru (II), mangan (IV) sau vanadiu (IV) s-au făcut determinări de parametri proteici sanguini la 24 de ore după iradierea întregului corp al șobolanilor “linia albino” de sex feminin cu radiații gama, la doze de 6 Gy. La finalul experimentului s-au făcut analize cantitative de proteine totale, albumine și globuline. Administrarea complexilor de cupru (II), mangan (IV) sau vanadiu (IV) înainte de iradiere au condus la scăderea semnificativă a proteinelor totale și a globulinelor serice. De asemenea, s-a observat o creștere semnificativă a albuminelor serice și a raportului albumine / globuline la șobolanii tratați cu complecși metalici comparativ cu grupul de șobolani netratați (Abou-Seif, 2003).

În figura 4-8 se prezintă cuanțumul albuminelor serice după administrarea în exces a manganului.

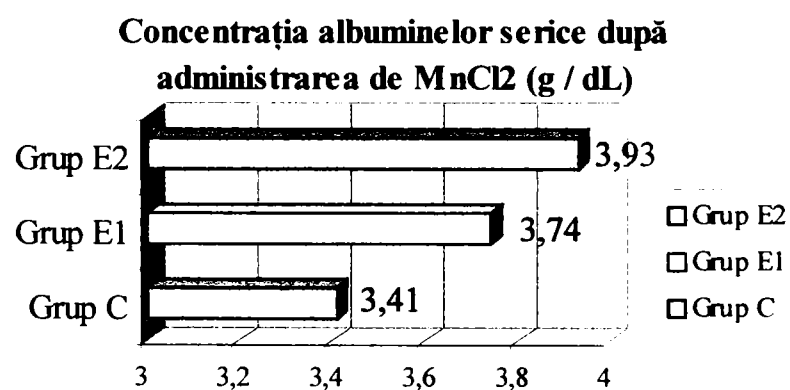


Fig. 4-8. Cuanțumul albuminelor serice după administrarea de soluții de clorură de mangan

Conform datelor din figura 4-8, la administrarea de mangan sub formă de sare – clorură de mangan – în concentrații mai mari decât cele recomandate se observă că are loc o creștere a concentrației albuminelor serice la ambele grupuri experimentale comparativ cu grupul de control. De asemenea, animalele la care s-a administrat Mn din grupul experimental E₂ (doza RDI x 4) prezintă o creștere a concentrației albuminelor față de animalele din lotul experimental E₁ (doza RDI x 2). Astfel, se poate afirma că la ingestia unor concentrații de mangan care depășesc ușor doza recomandată are loc o creștere a concentrației albuminelor serice. La ingestia unor concentrații care depășesc semnificativ doza recomandată de mangan concentrația albuminelor crește mai mult decât în cazul unor doze puțin peste RDI.

Concentrația globulinelor serice la grupul de control și cele două grupuri experimentale se prezintă în figura 4-9.

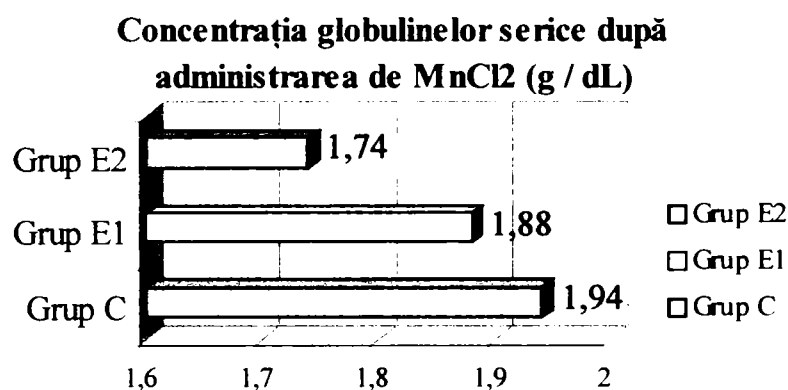


Fig. 4-9. Quantumul globulinelor serice după administrarea soluțiilor de clorură de mangan

Referitor la concentrația globulinelor serice (fig. 4-9) în urma experimentelor pe șobolani Wistar la care aportul de mangan depășește dozele recomandate, se observă că are loc o scădere a concentrației globulinelor după care scăderea se accentuează. Însă per ansamblu concentrația globulinelor la grupurile experimentale E₁ și E₂ rămâne semnificativ mai mică decât la grupul de control C.

Tabelul 4-4 prezintă variația concentrației glucozei serice la grupul de control și grupurile experimentale E₁ și E₂ în raport cu grupul de control C.

Tabél 4-4. Determinarea glucozei serice după administrare de clorură de mangan

Specificare grup de lucru	n	Concentrația glucozei serice (mg / dL)
		$\bar{X} \pm DS$
Grup C	10	158,44 ± 45,75
Grup E ₁	10	174,25 ± 56,57
ΔX_1		+ 15,81
Grup E ₂	10	202,60 ± 46,94**
ΔX_2		+ 44,16

Notă: n – număr animale de experiență; ** P < 0,01.

Cercetările experimentale efectuate pe șobolani linia Wistar arată că administrarea prin gavaj a unor cantități de mangan mult mai mari decât doza recomandată RDI determină o creștere a concentrației glucozei sanguine proporționale cu doza.

Figura 4-10 prezintă histograma cu variația glucozei serice la grupurile experimentale E₁ și E₂ comparativ cu grupul de control, grupuri formate din șobolani linia Wistar.

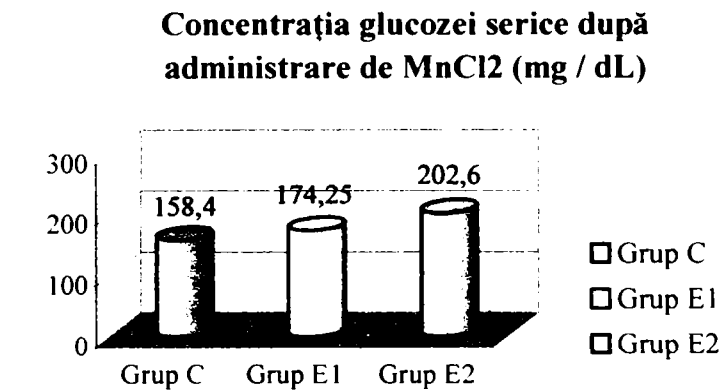


Fig. 4-10. Cuantumul glucozei serice după administrarea soluțiilor de MnCl₂ în concentrații diferite

Creșterea valorii glicemiei sanguine la grupurile experimentale comparativ cu grupul de control este progresivă, astfel că la grupul experimental E₁ după administrarea unei soluții de MnCl₂ în doză dublă (RDI x 2) glicemia crește cu 15,81mg/dL, iar la grupul experimental E₂ după administrarea de MnCl₂ în doză cvadruplă (RDI x 4) glicemia crește cu 44,16 mg/dL.

Conform datelor din literatura de specialitate, a studiului făcut de către Baly et al. (1985) pe șobolanii din linia Sprague-Dawley injectați intraperitoneal cu 40 mg mangan / Kg greutate corporală (administrat sub formă de soluție de clorură de mangan) după 2 ore au manifestat hiperglicemie. Creșterea concentrației de glucoză în sânge a fost însoțită de o scădere a insulinei plasmatice. Acest fapt poate fi explicat prin faptul că manganul s-a concentrat relativ rapid în pancreas (după 15 minute) și ficat (după 45 de minute). Glicemia șobolanilor din lotul experimental a scăzut, ajungând la valoarea glicemiei șobolanilor din lotul de control după aproximativ 8 ore de la injectarea animalelor cu clorură de mangan.

Același colectiv a reluat în 1990 studiile experimentale cu privire la efectele manganului asupra metabolismului glucidic. experimentele au fost realizate pe șobolani, iar rezultatele au demonstrat că deficiența de mangan influențează transportul glucozei sanguine și de asemenea, acțiunea realizării homeostaziei glicemiei (Baly et al., 1990).

Conform datelor din literatura de specialitate deficiența de mangan în organismul animalelor, asemănător organismului uman care duce și perturbarea metabolismelor glucidic, protidic, hidroelectrolitic, dar și lipidic, determinând scăderea sintezei și excreției de colesterol. Astfel, șobolanii la care s-a administrat mangan IV (sub formă complexată) înainte de iradiere cu radiații γ , au prezentat o creștere semnificativă a cuantumului colesterolului total sanguin comparativ cu șobolanii iradiați fără pretratare cu complecși metalici (Abou-Seif, 2003).

Prin administrarea de clorură de mangan, manganul intervine și la nivelul anabolismului și catabolismului lipidic, influențând astfel valoarea parametrilor biochimici din serul sanguin. În acest sens s-au făcut determinări de colesterol și

trigliceride serice din probe de sânge prelevat de la animalele supuse experimentelor, aceste date fiind prezentate în tabelul 4-5.

Tabel 4-5. Determinarea unor parametrii lipidici sanguini după administrare de clorură de mangan

Specificare grup de lucru	Concentrația unor lipide serice (mg / dL)			
	N	Colesterol	n	Trigliceride
		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$
Grup C	10	55,60 ± 8,63	10	98,80 ± 18,04
Grup E ₁	10	56,40 ± 15,56	10	63,40 ± 21,93*
ΔX_1		+ 0,80		- 35,40
Grup E ₂	10	61,20 ± 15,05	10	48,00 ± 14,39**
ΔX_2		+ 5,60		- 50,80

Notă: n – număr animale de experiență; * P < 0,05; ** P < 0,01.

Rezultatelor testelor biochimice de determinare a concentrației colesterolului și trigliceridelor se prezintă și în histograma următoare (fig. 4-11).

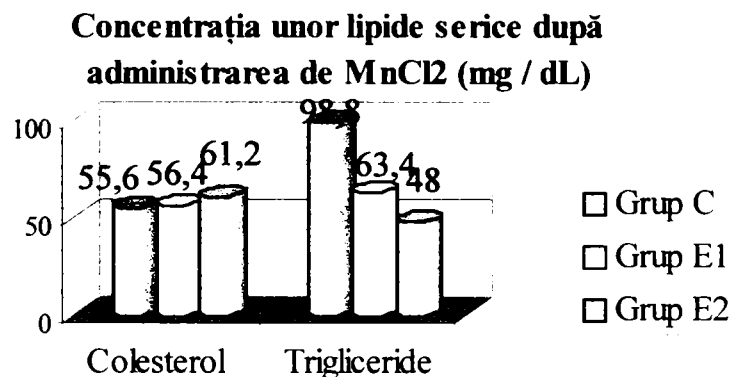


Fig. 4-11. – Variația concentrației de colesterol și trigliceride serice la șobolani linia Wistar după administrarea de MnCl₂.

Datele prezentate în urma cercetărilor efectuate pe șobolani de laborator, la administrarea de mangan în doză dublă față de cea recomandată (grupul E₁) demonstrează faptul că valoarea colesterolului seric crește puțin față de valoarea concentrației colesterolului la grupul de control (de la 55,6 la 56,4 mg / dL, respectiv 1,44%), iar la o doză cvadruplă de mangan (grupul E₂) valoarea colesterolului sanguin prezintă o creștere mai mare față de grupul de control (de la 55,6 la 61,2 mg / dL, respectiv 10,07%).

În ceea ce privește concentrația trigliceridelor serice se observă că o doză crescută de mangan determină o scădere ușoară a valorii trigliceridelor sanguine, iar la concentrații mai mari de mangan se observă o depresie accentuată a concentrației trigliceridelor serice. Baza biochimică a efectelor deficienței și excesului de mangan la animale nu a fost stabilită cu certitudine, dar poate fi corelată cu participarea manganului la numeroase reacții enzimatic.

Un alt criteriu de evaluare a efectelor administrării de clorură de mangan în concentrații diferite (dar mai mari decât doza recomandată pentru mangan) asupra animalelor supuse experimentelor este determinarea concentrației unor enzime serice. În acest sens s-au determinat următoarele enzime: alanil-amino-transferaza (ALT), asparagin-amino-transaminaza (AST), fosfataza alcalină (ALP) și amilaza (Tabel 4-6).

Pentru a explicita semnificațiile prescurtărilor folosite în tabelul 4-6 se redau în continuare denumirile în extenso pentru fiecare enzimă luată în studiu. Astfel, transaminaza ALT (sau ALAT) este alanil-amino-transferaza sau mai este prezentată sub denumirea de GPT – glutamat-piruvat-transaminaza. Transaminaza AST (sau ASAT) este asparagin-amino-transaminaza, fiind cunoscută și sub numele de GOT – glutamat-oxalat-transaminaza.

Tabel 4-6. Determinarea unor enzime serice după administrare de clorură de mangan

Specificare grup de lucru	Concentrația unor enzime serice (U / L)							
	Transaminaze				n	Fosfataza alcalină	n	Amilaza
	ALT	AST						
N	$\bar{X} \pm DS$	n	$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$	
Grup C	10	124,60±29,26	10	148,20±25,41	10	150,00±20,27	10	547,30±45,86
Grup E ₁	10	143,10±12,79	10	170,00±37,79	10	208,20±61,91**	10	635,25±30,83*
ΔX_1		+ 18,50		+ 21,80		+ 58,20		+ 87,95
Grup E ₂	10	138,00±39,88	10	158,60±36,50	10	210,00±104,03*	10	751,25±142,71**
ΔX_2		+ 13,40		+ 10,40		+ 60,00		+ 203,95

Notă: n – număr animale de experiență; * P < 0,05; ** P < 0,01.

Conform datelor prezentate în tabelul 4-6, concentrația alanil amino-transferazei și asparagin amino-transferazei în urma administrării de clorură de mangan dublul RDI crește cu 18,50 U / L pentru ALT și cu 21,80 U / L pentru AST comparativ cu grupul de control. La administrare de clorură de mangan cvadruplul RDI activitatea enzimelor prezintă o creștere cu 13,40 U / L pentru ALT și cu 10,40 U / L pentru AST raportat la concentrațiile acelorași enzime la control.

În cazul unui experiment efectuat pe șobolani de sex femel la care s-a administrat mangan (IV) sub formă complexată înainte de iradiere cu radiații γ , aceștia au prezentat o creștere a cantumului alanil-amino-transferazei și asparagin-amino-transferazei sanguine comparativ cu șobolanii iradiați fără pretratare cu compuși minerali (Abou-Seif, 2003).

Administrarea de mangan sub formă de clorură de mangan la șobolani linia Wistar determină o creștere a concentrației fosfatazei alcaline dependentă de doza de mangan administrată.

Figura 4-12 redă histogramele concentrațiilor unor enzime serice, date valorice prezentate în tabelul anterior (Tabel 4-6). Variația cantumul enzimelor serice mai sus amintite s-a determinat analitic la animale de experiență, șobolani Wistar, după administrarea de mangan în concentrații ce depășesc doza zilnică recomandată.

Cu privire la cantumul fosfatazei alcaline serice (notată ALP) la șobolanii la care s-a administrat prin gavaj soluție de clorură de mangan (dublul dozei RDI pentru Mn) s-a produs o creștere cu 58,20 U / L, iar la șobolanii la care s-a administrat prin gavaj soluție

de clorură de mangan (cvadruplu dozei RDI pentru Mn) creșterea a fost de 60,00 U / L. Acest fapt demonstrează că manganul este sinergic cu activitatea fosfatazei alcaline și o creștere a concentrației de mangan ingerate duce implicit la o creștere a fosfatazei alcaline la nivel sanguin.

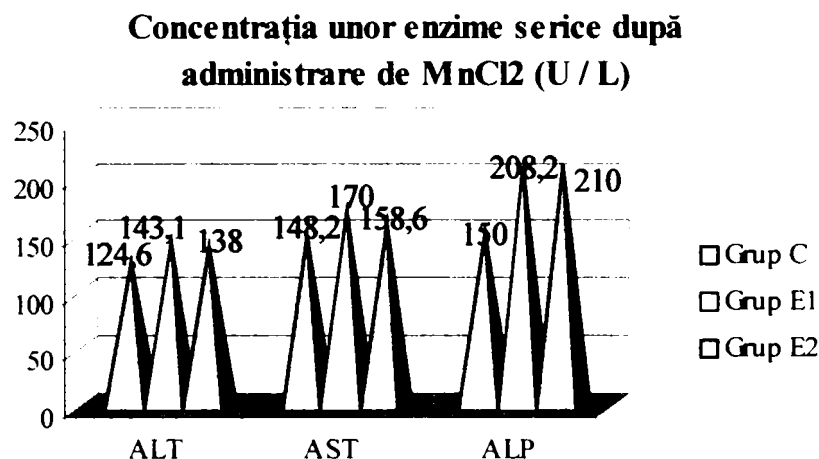


Fig. 4-12. Concentrația serică a alanil amino-transferazei (ALT), asparagin amino-transferazei (AST) și fosfatazei alcaline (ALP)

Și în cazul amilazei serice după administrarea de soluție de clorură de mangan în concentrații mai mari decât doza zilnică recomandată pentru mangan se procude o creștere la ambele grupuri experimentale E₁ și E₂ (Fig. 4-13).

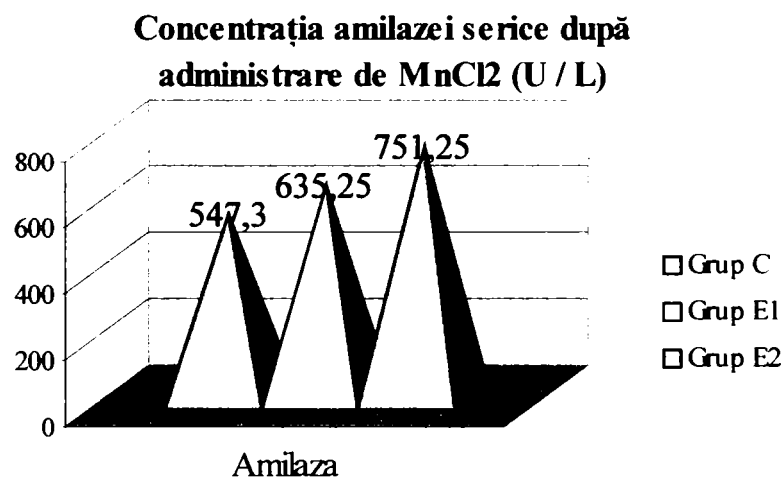


Fig. 4-13. Concentrația amilazei serice la șobolani linia Wistar după administrare de MnCl₂

Se remarcă faptul că la animale de experiență administrarea unor concentrații care depășesc doza recomandată pentru mangan determină creșterea concentrației unor enzime serice printre care și amilaza sanguină. În figura 4-13 se observă că după administrarea unei doze duble față de RDI pentru mangan concentrația amilazei sanguină crește cu 87,95 U / L față de control, iar la administrarea unei doze cvadruplu față de RDI amilaza salivară crește cu 203,95 U / L față de grupul de control. Efectul sinergic al manganului cu amilaza serice se poate observa și din acest studiu, care demonstrează că există o relație doză-efect dependentă între cele două caracteristici biochimice – cel puțin în cazul șobolanilor linia Wistar.

Literatura de specialitate, de asemenea, arată că există diverse studii pe animale experimentale (diverse linii de șobolani) care au pus în evidență modificarea activității enzimatică la șobolani la care s-a administrat mangan (sub diverse forme chimice) față de grupul de control.

Efectul manganului asupra enzimelor a fost cercetat și în cazul administrării în apa de băut în consum „ad libitum”. Astfel, un studiu experimental a presupus administrarea la șobolani a unei doze de $16\text{mg MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O/Kg}$ (adică $4,4\text{mg Mn / Kg}$) în apa de băut – doză calculată de către autori. Experimentul a durat cca. 30 zile și a urmărit evaluarea efectului manganului asupra activității unor enzime hepatice. Șobolani tratați cu clorură de mangan au prezentat depresii ale activității succin-dehidrogenazei, alcool-dehidrogenazei și β -amilazei comparativ cu activitatea aceluiași enzimelor la șobolani din lotul de control. În contrast cu aceste date, la șobolani tratați cu clorură de mangan s-a observat o creștere a activității monoamino-oxidazei (MAO), adenosin-trifosfatazei, arginazei, alanin-amino-transferazei, ribonucleazei, glucozo-6-fosfatazei și amilazei în ficat față de lotul de control (Shulka et al., 1978).

Alte studii experimentale pe șobolani au urmărit efectul administrării clorurii de mangan asupra activității enzimelor la nivelul creierului. Un astfel de studiu a fost realizat pe șobolani în perioada post natală. Aceștia au fost expuși la concentrații de 0 sau 1 sau 10 mg/ml clorură de mangan în apa de băut. În urma experimentului s-a observat că la șobolani din lotul experimental a crescut atât activitatea Na-K-ATP-azei cât și a Mg-ATP-azei în majoritatea regiunilor de la nivelul creierului față de lotul de control în ziua a 5-a și a 20-a postnatală, dar au scăzut până în ziua a 60-a. Aceste modificări ale enzimelor apar în ciuda unei creșteri dependente de doza de mangan de la nivelul creierului (Lai et al., 1991).

Pe de altă parte într-un studiu efectuat de Leung et al. (1993) nu s-au observat diferențe în ceea ce privește activitatea monoamin-oxidazei la nivelul creierului în cazul șobolanilor din lotul experimental comparativ cu lotul de control (martor).

Un alt studiu se referă la efectul administrării manganului asupra activității enzimatică la șobolani “linia albino”. În cadrul acestor cercetări Singh și colaboratorii (1979 – citat în “Health Effects Support Document For Manganese” – External Review Draft, EPA-R-02-029. April 2002) au experimentat administrarea manganului în soluție de sucroză (16 mg / kg în soluție de 10% sucroză) sau administrarea soluției de etanol (soluție de 10% etanol) alături de mangan în soluție de sucroză prezentată anterior, la loturi formate din 20 șobolani albino de sex masculin, pe durata a 30 zile. În urma acestui studiu s-a observat că expunerea la mangan în soluția de sucroză a determinat o creștere cu 72% a concentrației manganului la nivel de creier ($3,13\ \mu\text{g / g}$ substanță uscată față de $1,82\ \mu\text{g / g}$ pentru control). Această creștere nu a fost influențată nici de prezența etanolului și nu s-au evidențiat nici modificări morfologice la nivel de țesut în creier la nici un lot de șobolani. Însă în creier a fost perturbată activitatea unor enzime. Astfel, expunerea la mangan a condus la creșteri importante în activitatea monoamino-oxidazei ($P < 0,001$), adenosin-trifosfatazei ($P < 0,001$), ribonucleazei ($P < 0,001$) și aspartat-amino-transferase sau AST ($P < 0,001$). De asemenea, s-a observat o depresie a activității succin-dehidrogenazei ($P < 0,02$) și deoxiribonucleazei ($P < 0,001$). Expunerea concomitentă la mangan și etanol a condus la un efect sinergic cu activitatea unor enzime și antagonic cu alte enzime. În acest studiu nu a fost propus nici un mecanism care să explice observațiile prezentate în prezența etanolului.

Un alt studiu, în care s-au făcut determinări analitice de enzime serice, a urmărit evaluarea influenței tratării șobolanilor cu diverși complecși metalici înainte și după iradiere cu radiații γ . Astfel, s-a observat o scădere semnificativă a concentrației glutatation-reductazei și superoxid-dismutazei serice la șobolanii la care s-a administrat mangan IV (sub formă complexată) înainte de iradiere cu radiații γ , comparativ cu șobolanii iradiați fără tratare prealabilă cu complecși metalici (Abou-Seif, 2003).

Cu privire la toxicitatea manganului se menționează că sistemul nervos este prima țintă a ingestiei de mangan peste limitele admise. Astfel, doze cuprinse între 1 și 150mg mangan/Kg greutate corporală / zi, au produs efecte neurologice la șobolani și șoareci supuși experimentelor. La finea acestor studii s-a observat afectarea în principal a neurotransmițătorilor și modificarea concentrației enzimelor la nivelul creierului. Aceste modificări au fost deseori însoțite de semne clinice, cum ar fi necoordonarea mișcărilor și modificarea nivelelor de activitate la care animalele de experiență răspundeau pozitiv înainte de intoxicarea cu mangan (Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Manganese, 1992).

De asemenea, studii cu privire la carcinogenitatea manganului efectuate pe șobolani la care s-a administrat pe cale orală mangan în diverse doze timp de 2 ani au demonstrat o creștere evidentă a incidenței tumorilor (Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Manganese, 1992).

Alte studii realizate pe iepuri, porci și bovine au demonstrat că în cazul ingestiei cronice de mangan în concentrații de 1 – 2 mg mangan / Kg greutate corporală per zi se produc modificări de apetit și reducerea sintezei de hemoglobină (Mertz, 1987). De asemenea, în cazul toxicității cu mangan pe termen lung s-au observat modificarea concentrației de amine biogene și activitatea dopamin- β -hidrolazei și monoamino oxidazei din creierul șobolanilor supuși experimentelor (Eriksson et al., 1987; Lai et al., 1984; Subhash și Padmashree, 1990).

Tabelul următor (tabel 4-7) redă efectul administrării prin gavaj a unor concentrații crescute de mangan (față de RDI pentru mangan – stabilit pentru organismul uman) asupra unor electroliți sanguini reprezentați de metale alcaline: Na, K; alcalino-terose: Ca, Mg și de un oligoelement: Fe.

Tabel 4-7. Determinarea unor electroliți serici după administrare de $MnCl_2$

Specificare grup de lucru	Concentrația unor electroliți serici									
	n	Na (mg/dL)	n	K (mg/dL)	n	Ca (mg/dL)	n	Mg (mg/dL)	n	Fe (μ g/dL)
		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$
Grup C	10	322,46 \pm 2,02	10	20,50 \pm 3,34	10	10,20 \pm 0,34	10	2,53 \pm 0,58	10	120,40 \pm 27,23
Grup E ₁	10	362,48 \pm 3,95	10	26,40 \pm 7,63	10	11,64 \pm 1,26	10	3,32 \pm 1,31*	10	145,80 \pm 71,95*
ΔX_1		+ 40,02		+ 5,90		+ 1,44		+ 0,79		+ 25,40
Grup E ₂	10	363,40 \pm 5,63	10	29,90 \pm 10,63	10	10,58 \pm 0,37	10	3,76 \pm 1,51**	10	160,40 \pm 55,40**
ΔX_1		+ 40,94		+ 9,40		+ 0,38		+ 1,23		+ 40,00

Notă: n – număr animale de experiență; * P < 0,05; ** P < 0,01.

Pe baza datelor din tabelul 4-7 s-a realizat histograma din figura 4-14, care prezintă concentrația sodiului la grupul de control (C) comparativ cu grupurile experimentale (E₁ și E₂).

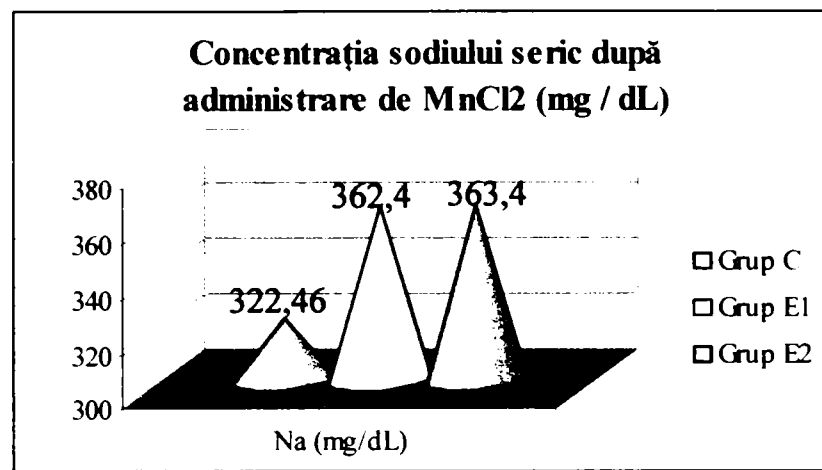


Fig. 4-14. Cuantumul sodiului seric după administrarea unei soluții de clorură de mangan

În urma administrării de mangan (doză dublă raportată la RDI) – în cazul sodiului sanguin – se observă că există o creștere la grupul experimental E₁ cu 40,02mg/dL față de grupul de control C, iar la administrarea manganului (doză cvadruplă față de RDI) în cazul grupului experimental E₂ creșterea concentrației față de control C este de 40,94mg/dL. Este evidentă creșterea concentrației sodiului după administrarea de mangan față de grupul de control pentru ambele grupuri experimentale. Valoarea concentrației sodiului nu este influențată atât de evident de mărirea concentrației manganului administrat. Astfel, diferența între concentrația sodiului seric după administrarea manganului în concentrație dublu RDI și concentrația sodiului după administrarea manganului în concentrație cvadruplu RDI este foarte mică, doar de 0,92mg/dL.

Figura 4-15 prezintă variația concentrației potasiului sanguin la animalele din grupul de control C și cele două grupuri experimentale E₁ și E₂.

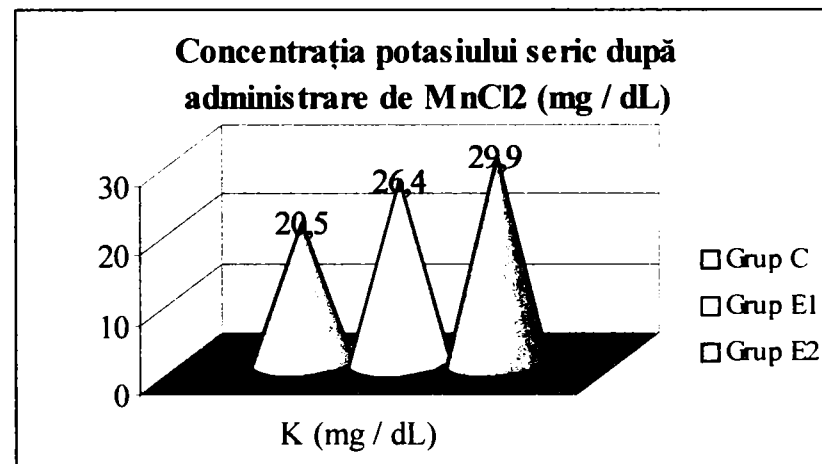


Fig. 4-15. Cuantumul potasiului sanguin după administrare de clorură de mangan

Urmarea administrării la șobolani Wistar prin gavaj a unor concentrații de mangan ce depășesc dozele recomandate – sub formă de soluții de clorură de mangan – este o creștere progresivă cu creșterea concentrației manganului administrat. Astfel concentrația potasiului la grupul E₁ față de control este cu 5,90 mg / dL mai mare, iar la grupul E₂ față de control este de 9,40 mg / dL.

Variația concentrației fierului sanguin după administrarea de clorură de mangan se redă sub formă de histogramă în figura 4-16.

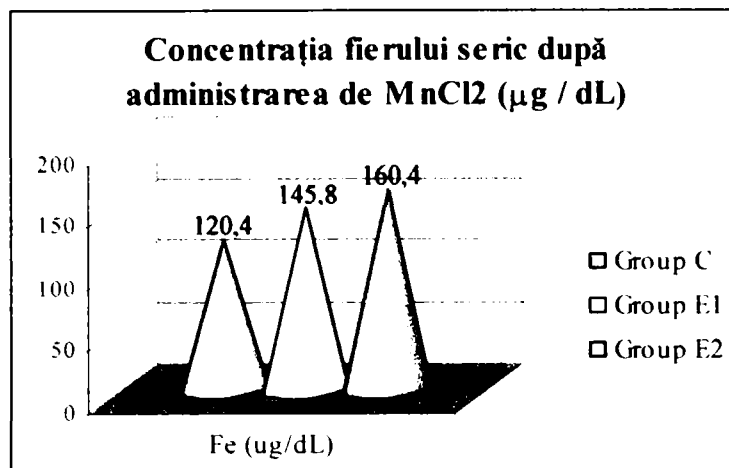


Fig. 4-16. Cuantumul fierului seric după administrarea de clorură de mangan

Referitor la valoarea concentrației fierului sanguin se poate observa din rezultatele experimentale obținute că există o relație dependentă și aproximativ proporțională cu doza de mangan ingerată. Astfel, după administrarea unei concentrații de mangan ce depășește doza recomandată, există o creștere a concentrației fierului în serul sanguin. Creșterea cuantumului fierului sanguin la lotul E₁ este de 25,40 µg / dL, iar la lotul E₂ concentrația fierului crește semnificativ cu 40,00 µg / dL.

Studii experimentale diverse demonstrează că persoanele care au deficiențe de fier pot prezenta riscul unei intoxicații cu mangan.

De asemenea, datele prezentate de Rossander-Hultén et al. (1991) arată că administrarea concomitentă a 7,5 sau 15 mg mangan (sub formă de clorură de mangan – MnCl₂) cu 3 mg fier (sub formă de sulfat feros – FeSO₄) a redus absorbția de mangan cu 20%, respectiv cu 34% la persoanele care au participat voluntar la acest studiu. La o administrare în doze mai mari de fier s-a observat de asemenea o reducere a absorbției manganului în procente similare cu cele prezentate anterior. Astfel, autorii au explicat acest fapt prin inhibarea competitivă care a apărut la momentul absorbției la nivel de mucoase (absorbție mucosonală). Când s-au administrat 3 mg fier și concomitent 15 mg mangan (într-un hamburger) s-a observat că s-a redus absorbția fierului cu 40%, ceea ce ar putea fi explicat prin faptul că alți liganzi din meniu nu au afectat interacția fier-mangan.

Într-un alt experiment prin care s-a procedat la administrarea de clorură de mangan (MnCl₂) în concentrație de 24,3 mg Mn / Kg corp prin gavaj la șobolani, o singură dată pe săptămână timp de patru săptămâni a dus la creșterea cu 68% a nivelului de mangan din sânge și la creșterea cu 22% a nivelului de mangan din cortex (Roels et al., 1997).

Există și cercetări prin care s-a urmărit dacă depozitele de mangan din organismul animal – Wistar rats – a fost influențat de prezența fierului. Astfel, rezultatele obținute de Chua și Morgan (1996) au concluzionat faptul că manganul și fierul interacționează în timpul transferului din plasmă către creier și alte organe, precum și faptul că interacția a fost mai degrabă sinergică decât antagonică. Aceste rezultate sugerează faptul că un aport excesiv de mangan și fier poate accentua riscul problemelor tisulare cauzat de un singur metal, în special la nivel de creier.

La administrarea cronică a unei supradoze de mangan sub formă de MnCl₂ la șobolani s-a urmărit distribuția de mangan, fier, cupru și zinc în plasmă, eritrocite, ficat și creier. Astfel, la grupul experimental s-a administrat MnCl₂ în doză de 30 mg / Kg corp / zi, timp de 50 de zile sub formă injectabilă – intraperitoneal. La finea experimentului concentrația de mangan din plasmă, eritrocite, ficat și creier a fost mai mare comparativ cu lotul de control. De asemenea, concentrația de fier din creier nu s-a modificat, în timp ce în ficat a crescut semnificativ față de control. Cuantumul de cupru și zinc din creier nu s-a

modificat. dar în ficat a crescut nivelul de cupru și zinc. Creșterea semnificativă a manganului din eritrocite poate să fie datorată MnSOD din mitocondrii. În această situație se poate să existe o cale de potențare a sistemului de apărare antioxidantă a organismului împotriva producerii de radicali liberi de oxigen prin inducerea de către mangan a reacției de oxidare (Zaloglu et al., 2002).

Șobolanii cu deficiență de fier au absorbit mai mult mangan ($24,4 \pm 6,6\%$) decât șobolanii din lotul de control ($12,5 \pm 4\%$) și decât șobolanii cu exces de fier ($5,0 \pm 2,8\%$) când determinările s-au făcut pe intestin. Deficitul de fier a fost realizat prin îndepărtarea de sânge și fier realizată prin injectarea intramusculară zilnică de dextran cu fier (în doză totală de 100 mg). Totuși, eliminarea de mangan a fost crescută la șobolanii cu deficiență de mangan, față de o scădere a excreției de mangan la șobolanii cu exces de mangan – mecanism explicat prin alterarea funcției de absorbție (Diez-Ewald et al., 1968).

Finley, în 1999, a inițiat un studiu cu privire la concentrația fierului comparativ cu efectele absorbției de mangan și "half-life-ul biologic" (timpul biologic de înjumătățire) pe un grup de 26 de femei. Rezultatele obținute au arătat că absorbția manganului a fost mai mare la pacientele cu dietă săracă în mangan ($0,7 \text{ mg Mn / zi}$) și cu un status scăzut de fier, iar la pacientele cu o dietă bogată în mangan ($9,5 \text{ mg Mn / zi}$) absorbția manganului a fost scăzută. Durata half-life-ului biologic a fost mai lungă la subiecții cu dietă săracă în mangan și status al fierului ridicat, respectiv mai scurtă la subiecții cu o dietă bogată în mangan. Concluzia finală a acestui studiu a fost că echilibrul fierului în organism nu a fost influențat de statusul fierului la aportul de mangan studiat.

Stokinger (1981b) a făcut un studiu experimental pe miei care au fost furajați cu o dietă îmbogățită cu mangan. Aceștia la finalul experimentului au prezentat o scădere a concentrației hemoglobinei, iar această observație este susținută și de afirmația că mari concentrații de mangan pot interfera cu absorbția intestinală de fier, ceea ce permite și explicarea apariției anemiei la oameni.

În urma unei toxicități cu mangan ca urmare a ingestiei orale poate apărea o anemie probabil datorită interferenței cu absorbția intestinală a fierului ca urmare a unui exces de mangan (Francis și Forsyth, 1995).

Studiul de față a urmărit – așa cum s-a prezentat și în tabelul 4-7 – și modificarea concentrației serice de calciu și magneziu după administrarea prin gavaj a unor concentrații de mangan ce depășesc doza zilnică recomandată, la șobolani linia Wistar. În figura 4-17 se prezintă histograma cu concentrația calciului și magneziului sanguin după administrarea de mangan.

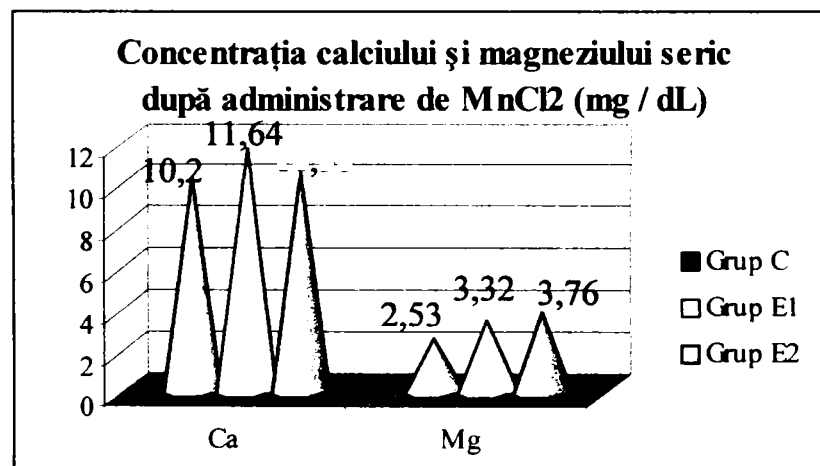


Fig. 4-17. Cuanțumul calciului și magneziului seric după administrarea de soluții de clorură de mangan

Ca urmare a administrării la șobolani prin gavaj a unor concentrații ce depășesc dozele recomandate de mangan – sub formă de soluții de clorură de mangan – se observă că atât în cazul calciului cât și în cazul magneziului există o creștere relativ proporțională cu creșterea concentrației manganului administrat. Excepție de la acest fapt face calciul la grupul E₂, când concentrația calciului crește față de grupul de control cu 0,38 mg / dL comparativ cu creșterea concentrației calciului la grupul E₁ de 1,44 mg / dL.

În ceea ce privește concentrația magneziului se observă că la administrarea unei concentrații de mangan – reprezentând dublul RDI la grupul E₁ – există o creștere cu 0,79 mg / dL, iar în cazul grupului E₂ (cvadruplul RDI pentru Mn) creșterea este de 1,23 mg / dL. Acest lucru se poate explica prin faptul că o creștere a concentrației manganului ingerat determină creșterea concentrației magneziului sanguin, dar care este progresivă cu concentrația manganului ingerat.

Literatura de specialitate demonstrează că există o influență a manganului ingerat și asupra unor electroliți serici la șobolani, care este specifică însă pentru fiecare loc de acțiune (organ, mușchi etc.). Astfel, ca urmare a injectării de mangan direct în creier la șobolani (Sloot et al., 1994) s-a dovedit că injectarea intrastriatală de clorură de mangan produce o acumulare de calciu (0,4 μmol) dependentă de timp și o depleție de dopamină (0,05-0,8 μmol) dependentă de doză.

Efectele neurotoxice ale manganului au fost de asemenea observate la animalele de laborator. Alte efecte adverse atribuite manganului sunt anemia și alte alterări ale parametrilor hematologici (Expert Group on Vitamins and Minerals Meeting – Nutrition, Review of Manganese, 2002).

S-a demonstrat experimental că un quantum ridicat de fibre alimentare, de calciu, fosfor și fitat determină o creștere a necesarului de mangan probabil datorită formării unor complecși insolubili (Mertz A. și Mertz O., 1994).

De asemenea, administrarea de diete cu aport scăzut de fosfor la șobolani de experiență a contribuit la instalarea așa numitului “rahitism mangan” (retardare de creștere și demineralizarea oaselor observată în urma unor studii făcute pe rozătoare) – Svensson et al., 1985 – citat în „Expert Group on Vitamins and Minerals Meeting – Nutrition, Review of Manganese”, 2002.

Freeland-Graves și Lin în 1991 au demonstrat că cuprul și calciul pot scădea quantumul manganului din plasmă în timp ce zincul poate crește nivelul manganului din plasmă. Un alt studiu a avut în vedere investigarea efectului unor componente din dietă asupra absorbției de ⁵⁴Mn la un grup de adulți voluntari. Adăusul de calciu, dar nu și de mangan reduce absorbția manganului din laptele matern uman (Davidsson et al., 1991). Totuși, un studiu realizat pe un grup de femei voluntare a arătat că un aport crescut de calciu de 200-800 mg / zi nu are nici un efect asupra quantumului de mangan din organism (Spencer et al., 1979).

Aportul de mangan poate duce la scăderea absorbției și la creșterea excreției de magneziu deși poate înlocui magneziul în unele sisteme enzimatice care necesită magneziu (Watts, 1988).

De asemenea, un alt studiu efectuat pe o perioadă de 5 săptămâni realizat pe porci a urmărit efectul unor variații ale concentrațiilor de mangan în diete cu deficit de magneziu. Astfel toți cei 8 porci din lotul care a primit diete bogate în mangan (0,95 mmol Mn / Kg meniu) au murit în urma unor accese convulsive, comparativ cu 2 din 6 porci în lotul care au primit diete sărace în mangan (0,040 nmol Mn / Kg meniu) – Miller et al., 2000. Un studiu ulterior a demonstrat faptul că s-au găsit concentrații

semnificativ scăzute de mangan în mușchiul cordului la porcii care au primit diete bogate în mangan față de porcii care au primit diete cu concentrații scăzute de mangan.

Un studiu realizat pe adolescente a demonstrat că un adaos de fitat, fosfat și acid ascorbic la "infant formula" (alimente cu proprietăți nutritive speciale destinate sugarilor) și un adaos de fier și magneziu la pâinea de grâu nu a influențat absorbția manganului. De asemenea, s-a demonstrat că substituirea cărnii cu 30% soia nu a influențat retenția de mangan. Totuși, cunatumul fitatului din dietă provenit din soia a fost doar de 0,02% (Greger et al., 1978).

Distribuția diferitelor forma chimice ale manganului sau compușilor acestuia pot varia foarte mult (Komura și Sakamoto, 1992). Patru grupe de șoareci linia ddX de sex masculin au fost hrăniți cu o dietă care conținea 2000 mg / Kg mangan sub formă de dioxid de mangan (MnO_2), sau unul din compușii manganului divalent – clorură de mangan ($MnCl_2$), carbonat de mangan ($MnCO_3$) și acetat de mangan ($(CH_3COO)_2Mn$) timp de un an (ultimii doi compuși ai manganului sunt cei mai solubili în apă). Doza administrată raportată la greutatea corporală a fost estimată la 300 mg / Kg greutate corporală / zi după consultarea prevederilor WHO, 1987 – citată de Komura și Sakamoto, 1992. Tratamentul cu clorură de mangan a determinat creșterea concentrației de mangan în sânge, fapt care nu s-a confirmat la administrarea altor compuși de mangan.

Un alt studiu cu privire la toxicitatea manganului a arătat că etanolul determină o accentuare a toxicității manganului pentru organismul uman. Cercetările efectuate pe șobolani de experiență la care s-a administrat în apa de băut etanol și clorură de mangan au arătat că în creier și ficat a crescut cuantumul de mangan comparativ cu administrarea de apă de băut cu clorură de mangan (după US Department of Health and Human Services, 1997).

În anul 1977 Banta și Markesbery au raportat un posibil caz de intoxicație cu mangan, datorat consumării unor suplimente alimentare timp de 4 – 5 ani, soldat cu decesul pacientului respectiv. Astfel, un bărbat de 59 ani care consuma de 4 – 5 ani suplimente alimentare cu vitamine și minerale a fost internat în spital datorită unor probleme de confuzie, inabilitate agresivă la continuarea lucrului și simptome motorii asemănătoare celor de la boala Parkinson, iar ulterior a decedat. La autopsie s-au găsit concentrații ridicate de mangan în serul sanguin, păr și creier. Acest fapt s-a presupus (fără a putea fi demonstrat) că era o consecință a suplimentelor alimentare pe care le-a consumat în ultimii ani ai vieții – probabil fără consultarea unui medic de specialitate.

Diverși cercetători au presupus o oarecare legătură între concentrațiile ridicate de mangan în probele de păr și capacitatea de învățare a copiilor (Collipp et al., 1983). Aceștia afirmă că acest fapt este posibil să fie determinat și de alți factori cum ar fi concentrații ridicate de plumb și deci nu este posibil să se stabilească o cauză certă și o legătură între aceste două aspecte prezentate mai sus, dar este un subiect pentru studiile neurologice viitoare.

De asemenea, un alt studiu sugerează faptul că o toxicitate acută a manganului poate fi unul din factorii care conduc la comportamentul violent al unei ființe (Gottschalk et al., 1991).

Pentru a avea o privire generală și asupra metabolismului compușilor azotați neproteici după administrarea de mangan (sub formă de soluție de clorură de mangan) în doze ce depășesc doza zilnică recomandată (RDI) s-au făcut determinări cantitative de acid uric, creatinină și azot ureic din ser sanguin (Tabel 4-8) prelevat de la șobolani linia Wistar.

Tabel 4-8. Determinarea acidului uric, creatininei și azotului ureic seric după administrare de clorură de mangan

Specificare grup de lucru	Concentrația unor compuși serici (mg / dL)					
	n	Acid uric	n	Creatinină	n	Azot ureic
		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$
Grup C	10	2,78±0,96	10	0,54±0,07	10	29,50±4,22
Grup E ₁	10	3,34±1,58	10	0,70±0,10	10	37,00±11,24
ΔX_1		+ 0,56		+ 0,16		+ 7,50
Grup E ₂	10	3,50±2,03*	10	0,75±0,05**	10	38,80±8,04**
ΔX_2		+ 0,72		+ 0,21		+ 9,30

Notă: n – număr animale de experiență; * P < 0,05; ** P < 0,01.

Datele prezentate în tabelul de mai sus arată că în urma creșterii cantității de mangan ingerată, crește progresiv și continuu și concentrația acidului uric, creatininei și azotului ureic. În fig. 4-18 se prezintă histograma cu modificările concentrațiilor acidului uric și creatininei, iar fig. 4-19 prezintă histograma concentrației azotului ureic – determinate din ser sanguin, la grupurile experimentale E₁ și E₂ comparativ cu grupul de control.

Concentrația acidului uric și a creatininei după administrarea de MnCl₂ (mg/dL)

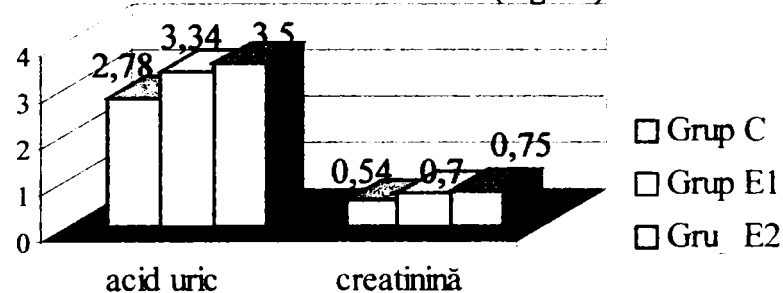


Fig. 4-18. Modificarea concentrației acidului uric și creatininei din serul sanguin după administrare de MnCl₂

În urma administrării unei concentrații duble de mangan față de doza recomandată, la grupul experimental E₁ crește concentrația acidului uric cu 0,56 mg / dL comparativ cu grupul de control. La administrarea unei doze cvadruple de mangan față de cea recomandată concentrația acidului uric seric la grupul experimental E₂ crește cu 0,72 mg / dL față de control. Și în cazul creatininei serice, după administrarea unor doze de mangan mai mari decât cele recomandate se produce o creștere a creatinei cu 0,16 mg / dL pentru grupul E₁, iar pentru grupul E₂ o creștere cu 0,21 mg / dL comparativ cu grupul de control. Pentru ambele cazuri se observă că ingestia unor cantități mari de mangan comparativ cu dozele zilnice recomandate (RDI) determină modificarea concentrației unor parametrii biochimici serici, care de fapt arată eventualele disfuncții metabolice.

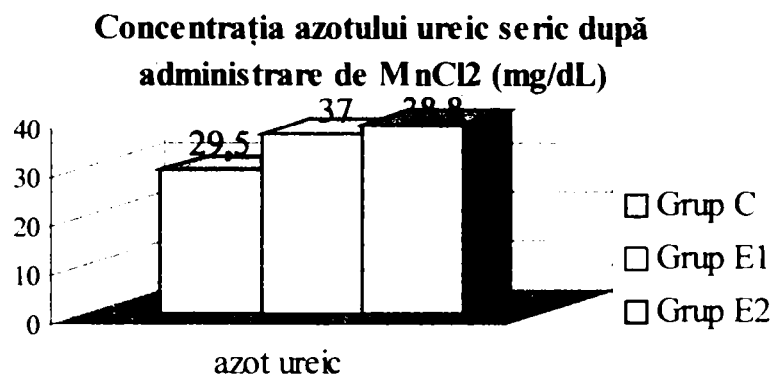


Fig. 4-19. Variația concentrației azotului ureic din serul sanguin după administrare de MnCl₂

Un alt parametru de “control” al metabolismului protidic (ureogeneza) și a funcției renale este reprezentat de concentrația azotului ureic din ser sanguin. Astfel, și în cazul administrării unor soluții de clorură de mangan care conțin mangan în concentrație dublă și cvadruplă în raport cu RDI, se observă o mărire a cuantumului azotului ureic la grupul experimental E₁ cu 7,50mg / dL și la E₂ cu 9,30 mg/dL comparativ cu grupul de control.

În literatura de specialitate se regăsesc diverse cercetări experimentale pe șobolani sau șoareci care urmăresc, de asemenea, modificarea unor caracteristici biochimice ale funcției renale după administrarea de mangan sub diverse forme și în concentrații variate.

Astfel, s-a efectuat un studiu experimental pe șobolani care au fost supuși unei diete cu deficit de mangan pe parcursul a 21 de zile (Brock et al., 1994). Testele biochimice au demonstrat că șobolanii din lotul experimental au prezentat concentrații mari de amoniac în plasmă și concentrații scăzute de uree în plasmă. Acestea au fost asociate cu concentrații scăzute de mangan hepatic și o scădere a activității arginazei comparativ cu șobolanii din lotul martor care au primit o dietă care conținea 48 μg Mn per gram furaj.

Un studiu în care s-au făcut determinări analitice de compuși azotați neproteici a urmărit evaluarea influenței tratării șobolanilor cu diverși complecși metalici înainte și după iradiere cu radiații γ. Astfel, s-a observat o creștere semnificativă a concentrației ureei serice și a creatininei la șobolanii la care s-a administrat mangan (IV) sub formă complexată înainte de iradiere cu radiații γ, comparativ cu șobolanii iradiați fără tratare prealabilă cu compuși minerali (Abou-Seif, 2003).

Tabelul 4-9 prezintă modificarea bilirubinei totale la șobolani linia Wistar după administrarea de mangan în concentrații mai mari decât cele recomandate a fi ingerate, sub formă de soluție de clorură de mangan prin gavaj, direct în stomac.

Determinarea bilirubinei totale a avut în vedere evaluarea primară a funcției hepatice (ficatului) atunci când are loc o ingestie a unor cantități mai mari de mangan decât cele recomandate.

Efectul manganului asupra ficatului (bilirubinei) și activității enzimelor serice pare să fie sinergic (Schulka G.S. și Schulka A, 1976; Schulka A. și Schulka G.S., 1989).

Tabel 4-9. Determinarea bilirubinei totale serice după administrare de $MnCl_2$.

Specificare grup de lucru	n	Bilirubină totală (mg / dL)
		$\bar{X} \pm DS$
Grup C	10	0,13 \pm 0,05
Grup E ₁	10	0,18 \pm 0,04*
ΔX_1		+ 0,05
Grup E ₂	10	0,18 \pm 0,04*
ΔX_2		+ 0,05

Notă: n – număr animale de experiență; * P < 0,05.

Datele prezentate în tabelul 4-9, cu privire la variația concentrației bilirubinei totale din ser sanguin, au fost reprezentate și sub forma unor histograme și sunt redată în figura 4-20.

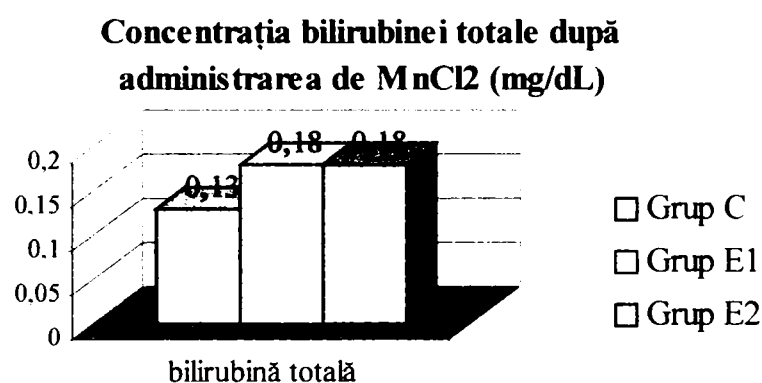


Fig. 4-20. Modificarea concentrației bilirubinei totale sanguine după administrare de $MnCl_2$

Date din literatura de specialitate cu privire la mangan în relație cu organismul uman au demonstrat că absorbția ^{54}Mn din suc a fost semnificativ mai mare la femei comparativ cu bărbații, dar timpul de înjumătățire a fost mai lung la bărbați decât la femei (Finley et al., 1994).

Alte studii experimentale referitoare la efectul produs de administrarea unor doze crescute de mangan față de cele recomandate sunt prezentate în continuare. Astfel, în cadrul unui experiment s-au administrat doze de 0,2; 1 și 10 mg Mn / Kg corp (sub formă de clorură de mangan) prin gavaj la șobolani de experiență și a observat că în perioada de 0,5 – 6,5 ore s-a excretat 3,4% din Mn în bilă, existând și o corelare între doza de mangan administrată și creșterea concentrației de mangan în bilă după administrare (Malecki et al., 1996). De asemenea, s-a constatat că dietele cu conținut scăzut sau crescut de grăsimi nu au influențat excreția de mangan.

La șobolani care au primit diete cu concentrații scăzute de mangan (0,49 mg Mn / Kg furaj) sau o dietă cu concentrații normale de mangan (72 mg Mn / Kg furaj) timp de 8 săptămâni s-a observat că excreția biliară a fost doar de 0,7% din excreția biliară de Mn – colectată în primele 4 ore de la administrare (Malecki et al., 1996).

Pacienții cu probleme ale excreției biliare pot fi vulnerabili la acumulări de mangan și chiar intoxicații cu mangan. Între acești pacienți intră cei cu boli hepatice și

persoanele vârstnice. În mod similar, unii cercetători au notat faptul că secreția de acid biliar este lentă la copii ceea ce ar putea duce la o potențială intoxicație cu mangan (Knudsen et al., 1996). Manganul în mod special se acumulează în țesuturi bogate în mitocondrii asemeni ficatului și pancreasului.

Din datele prezentate în figura 4-20 se observă că manganul are influență asupra variației concentrației bilirubinei totale, respectiv intervine în activitatea funcției hepatice. În urma administrării unor concentrații diferite de mangan, dar mai mari decât cele recomandate, se observă că se produce o creștere a concentrației bilirubinei totale cu 0.05 mg / dL față de control atât pentru grupul E₁, cât și pentru grupul E₂. Această creștere se menține și în cazul ingestiei unor concentrații foarte mari de mangan.

Administrarea la șobolani a clorurii de mangan nu a protejat celulele de toxicitatea H₂O₂. Însă, administrarea concomitentă a staniu-porfirinei (inhibitor al hem-oxigenazei) și a mangan-1-metil-4-piridil-porfirinei (efector al superoxid-dismutazei) reduce toxicitatea H₂O₂. În concluzie, acțiunea protectivă a mangan-1-metil-4-piridil-porfirinei nu a fost dependentă de prezența ionului de mangan (III).

Complexul mangan-bilirubină induce colestază la șobolani în asociație cu alterarea compoziției lipidelor a diverse fracții subcelulare hepatice (Duguay et al., 2000; Goering, 2003). Astfel, în vederea inducerii unei colestaze se administrează intravenos mangan (4,5 mg/Kg corp) și bilirubină (25 mg/Kg corp), după care în cca 30 minute animalele pot fi sacrificate în vederea prelevării probelor pentru determinările biochimice propuse a se realiza. În concluzie, tratamentul cu complexul mangan-bilirubină poate afecta dinamica proceselor metabolice ale colesterolului intracelular.

4.3.2. Efectele induse de zinc asupra unor metaboliți sanguini

Pentru organism zincul este un element esențial, iar necesarul recomandat este de 5 mg pentru copii și 15 mg pentru adulți (Opresko, 1992)

Absorbția gastrointestinală a zincului este variabilă (între 20-80%) și este dependentă de forma chimică în care se află, dar și de cantumul zincului din organism și concentrația acestuia din ceilalți nutrienți din dietă. La persoanele cu un cantum normal de zinc din organism absorbția gastrointestinală este de 20 – 30% (Agency for Toxic Substances and Disease Registry – Toxicological profile for Zinc, 1989). Absorbția pe cale respiratorie a zincului (prin pulmon) este limitată și este complicată de potențialul gastrointestinal de absorbție atât prin clearance-ul mucociliar (mucociliary clearance) din tractul respirator cât și prin cantitatea de zinc inhalată.

Zincul este prezent în toate țesuturile având concentrațiile cele mai mari în prostată, rinichi, ficat, cord și pancreas (Opresko, 1992). Zincul este un component vital al multor metaloenzime cum ar fi carbonic anhidraza – care are rolul de a echilibra concentrația dioxidului de carbon (CO₂) – Stokinger, 1981. Mecanismul homeostatic implică metalotioneina din celulele mucoasei tractului gastrointestinal care controlează absorbția și excreția zincului (Bremner, 1987a; Bremner 1987b; Agency for Toxic Substances and Disease Registry – Toxicological profile for Zinc, 1989).

În cardul pregătirii lucrării de față s-au făcut studii experimentale privind efectul indus de zinc la animale de laborator – respectiv șobolani linia Wistar. În acest sens s-au urmărit modificarea unor aspecte metabolice în relație cu cantumul de zinc administrat (Vincu et al., 2000b).

În continuare se vor prezenta date cu privire la distribuția unor metaboliți serici în șobolani linia Wistar după administrarea prin gavaj a clorurii de zinc la concentrații de zinc mai mari decât doza zilnică recomandată (RDI) și anume doza dublă la grupul E₃ și doza cvadruplă la grupul E₄.

Se impune menționarea faptului că în tabele următoare se prezintă media concentrației unor metaboliți sanguini (\bar{X}) și deviația standard (DS). Valoarea ΔX_i reprezintă diferența dintre concentrația medie la grupul de control (\bar{X}_C) și concentrația medie la grupul experimental (\bar{X}_{Ei}), adică grupurile E₃ și E₄.

Urmând protocolul experimental stabilit s-au determinat proteinele totale, precum și fracțiunile albuminice și globulinice din serul sanguin. Datele obținute se prezintă în tabelul 4-10.

Tabel 4-10. Determinarea unor parametrii proteici sanguini după administrare de clorură de zinc

Specificare grup de lucru	Concentrația proteinelor serice (g / dL)					
	n	Proteine totale	n	Albumine	n	Globuline
		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$
Grup C	10	5,35 ± 0,42	10	3,41 ± 0,23	10	1,94 ± 0,40
Grup E ₃	10	5,68 ± 0,45	10	3,30 ± 0,83	10	2,38 ± 1,08*
ΔX_3		+ 0,33		- 0,11		+ 0,44
Grup E ₄	10	5,76 ± 0,38	10	3,25 ± 0,31	10	2,51 ± 0,69**
ΔX_4		+ 0,41		-0,16		+ 0,57

Notă: n – număr animale de experiență; * P < 0,05; ** P < 0,01.

Dintre parametrii serici care s-au urmarit în urma administrării soluției de clorură de zinc în concentrații care depășește doza zilnică recomandată au fost și proteinele totale și cele două fracții proteice: albuminele, respectiv globulinele serice (tabel 4-10).

Histograma prezentată în figura 4-21 pune în evidență modificarea proteinelor totale serice la grupul de control (C) față de cele două grupuri experimentale (E₃ și E₄).

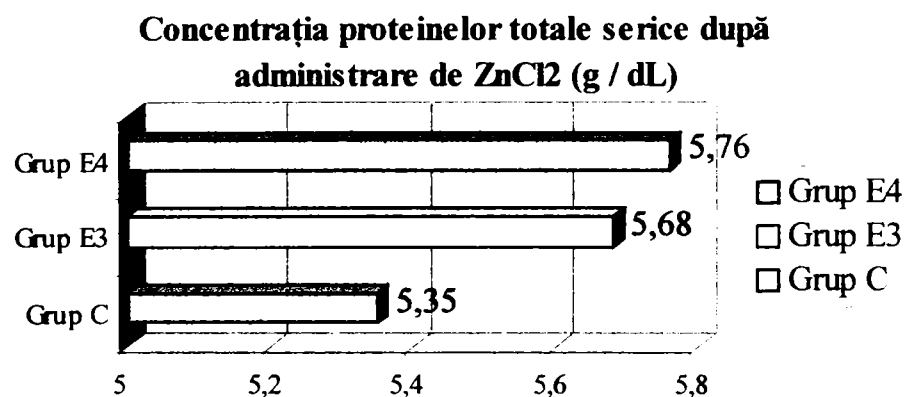


Fig. 4-19. Variația concentrației proteinelor totale serice după administrarea de ZnCl₂

După administrarea soluțiilor de clorură de zinc la șobolani linia Wistar în concentrații ce depășesc doza zilnică recomandată se observă modificarea unor parametrii biochimici proteici la nivel sanguin. Astfel, în cazul proteinelor totale la administrarea de $ZnCl_2$ dublul RDI se observă o creștere a concentrației proteinelor totale cu 0,33 g / dL ser sanguin, iar la administrarea $ZnCl_2$ cvadruplul RDI se observă o creștere cu 0,41 g / dL ser sanguin.

Studii experimentale au demonstrat că dietele cu concentrații ridicate de fitați, calciu sau fosfor reduc absorbția zincului în organismul uman, dar determină creșterea concentrației proteinelor serice (Opresko, 1992).

Figura 4-22 reprezintă variația cantumului de albumine serice, iar fig. 4-23 nivelul globulinelor la șobolani după administrarea de zinc în exces.

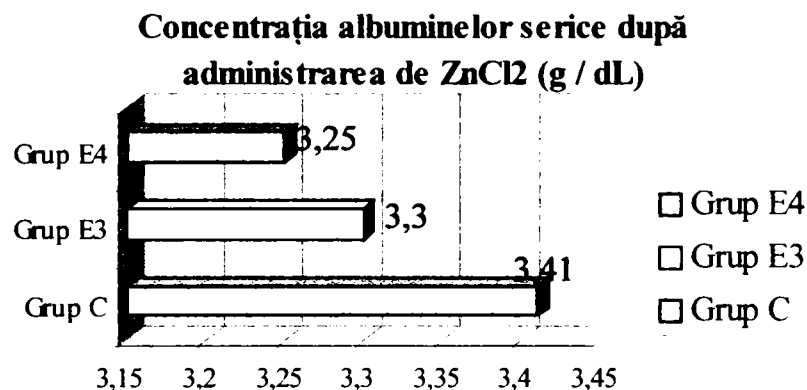


Fig. 4-22. Variația concentrației albuminelor serice la administrarea de clorură de zinc în doze diferite

La administrarea unor soluții cu concentrații de clorură de zinc mai mari decât doza zilnică recomandată se observă că apare o scădere a concentrației albuminelor serice proporțională cu creșterea concentrației de sare administrată. Astfel, la dublul RDI pentru zinc concentrația albuminei serice scade cu 0,11 g / dL ser sanguin, iar la cvadruplul RDI pentru zinc concentrația albuminelor serice scade cu 0,16 g / dL ser sanguin.

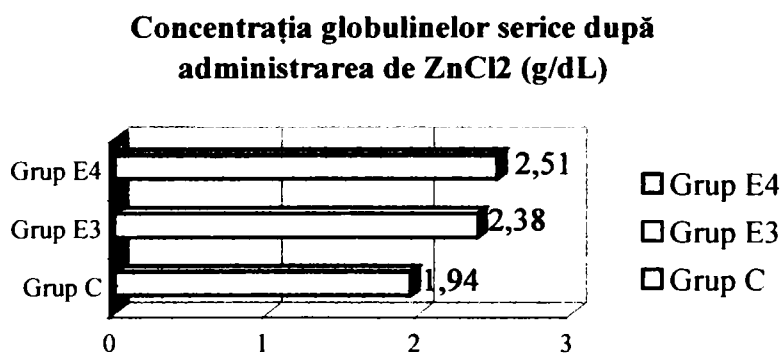


Fig. 4-23. Cantumul globulinelor serice la grupul de control comparativ cu cele experimentale după administrarea de $ZnCl_2$

Modificarea concentrației globulinelor serice la grupul de control comparativ cu grupurile experimentale, după administrarea în exces de zinc, se prezintă în figura 4-23. La șobolani linia Wistar după administrarea unor concentrații de clorură de zinc dublul RDI pentru Zn (grupul experimental E₃) concentrația globulinelor serice crește cu

0,44 g / dL. De asemenea, la creșterea dozei de zinc cvadruplul RDI pentru Zn (grupul experimental E₄) concentrația globulinelor serice crește cu 0,65 g / dL. Astfel, se poate observa că în cazul unui exces de zinc nu se produce o creștere proporțională a globulinelor serice, dar per ansamblu concentrația globulinele serice crește.

În organismul uman, după absorbția zincului acesta se leagă de proteine, formând complexe proteice – dintre care cea mai importantă este metalotioneina. Acesta este un mecanism al proceselor metabolice de transport la zincului în organism (Stokinger, 1981b).

Experimentele pe animale ierbivore (ovine) au demonstrat că prin consumul zilnic al unor furaje care conțin doze ridicate de zinc, dar necuantificate exact (ca urmare a poluării mediului înconjurător) acestea au manifestat simptome de intoxicație concretizate prin diaree, proteinurie, leziuni intestinale, precum și degenerarea celulelor pancreatice (Allen et al., 1983; Allen et al., 1986).

În vederea punerii în evidență a modificărilor de metabolism glucidic la șobolanii care au avut un aport de zinc în exces s-a determinat și concentrația glucozei serice (tabel 4-11).

Tabel 4-11. Determinarea glucozei serice după administrare de clorură de zinc

Specificare grup de lucru	Concentrația glucozei (mg / dL)	
	n	Glucoză serică
		$\bar{X} \pm DS$
Grup C	10	158,44 ± 45,75
Grup E ₃	10	174,22 ± 60,51
ΔX_3		+ 15,78
Grup E ₄	10	220,33 ± 81,78**
ΔX_4		+ 61,89

Notă: n – număr animale de experiență; ** P < 0,01.

Pentru a avea o imagine asupra modificării glicemiei survenite după administrarea de zinc în exces s-a determinat și concentrația de glucoză din sânge. Figura 4-24 prezintă histograma cu variația acestui parametru la șobolani linia Wistar după administrarea unor săruri de zinc.

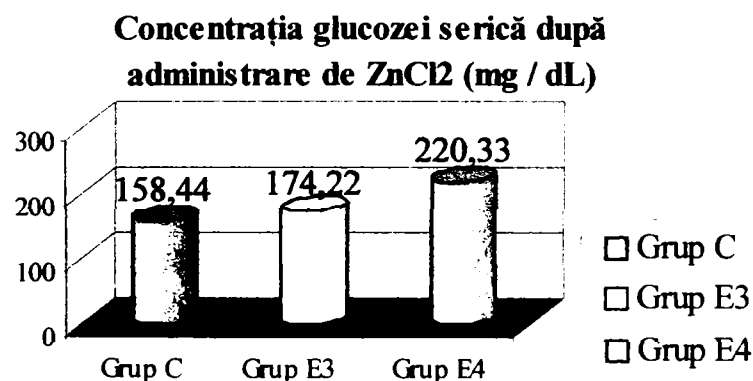


Fig. 4-24. Modificarea cantumului glucozei din sânge la șobolani determinată de administrarea de clorură de zinc

Clorura de zinc și mai precis ionul de zinc determină la grupul E₃ (dublul dozei RDI pentru Zn) o creștere moderată a concentrației glucozei serice (cu 15,78 mg/dL), iar la grupul E₄ (cvadruplul dozei RDI pentru Zn) se observă o creștere semnificativă a concentrației glucozei sanguine (cu 61,89 mg/dL). Acest fapt ar putea fi urmarea creșterii activității metabolismului glucidic cu formare de glucoză, determinată tocmai de prezența unui exces de zinc.

Pentru a observa dacă există modificări la nivelul metabolismului lipidic s-au făcut determinări de colesterol și trigliceride din sânge provenit de la șobolani la care s-a administrat zinc în exces (tabel 4-12).

Tabel 4-12. Determinarea unor parametrii lipidici sanguini după administrare de clorură de zinc

Specificare grup de lucru	Concentrația lipidelor serice (mg / dL)			
	n	Colesterol	n	Trigliceride
		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$
Grup C	10	55,60 ± 8,63	10	98,80 ± 18,04
Grup E ₃	10	55,80 ± 8,29	10	84,40 ± 26,19
ΔX_3		+ 0,20		- 14,40
Grup E ₄	10	58,20 ± 13,12	10	79,10 ± 32,53
ΔX_4		+ 2,60		- 19,70

Notă: n – număr animale de experiență

Variațiile concentrației de colesterol și trigliceride sunt foarte mici la grupurile experimentale (E₃ și E₄) comparativ cu grupul de control (C). Per ansamblu, după ingestia în exces a zincului concentrația colesterolului seric crește, iar concentrația trigliceridelor serice scade. Aceasta ar putea fi explicată prin implicațiile zincului în activitatea unor enzime care intervin în metabolismul lipidic.

În continuare se face o prezentare sub formă de histogramă a variației concentrației colesterolului și trigliceridelor din sânge la animale de experiență (fig. 4-25).

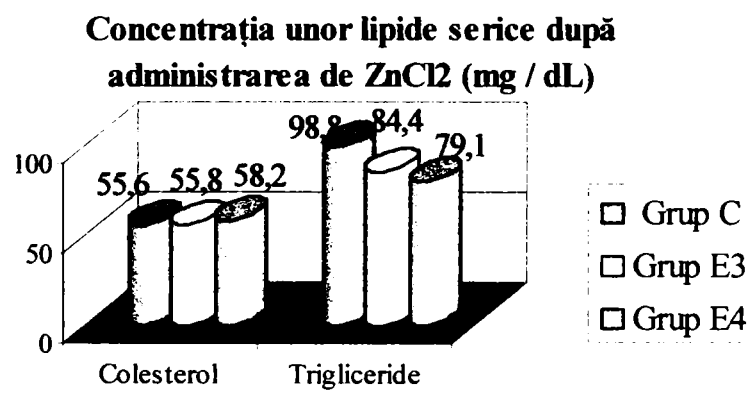


Fig. 4-25. Variația unor lipide serice după administrarea de clorură de zinc la șobolani

Din prezentarea făcută anterior se observă că există o modificare pozitivă minoră a concentrației colesterolului seric după administrarea de clorură de zinc în concentrații crescute față de ceea ce se recomandă (RDI). Cu privire la modificarea concentrației trigliceridelor serice la șobolani linia Wistar se constată că la ingestia unor concentrații mai mari de zinc se produce o ușoară depresie a cuantumului trigliceridelor.

Efectele toxice sunt severe în cazul ingestiei de cloruri de zinc (Chonabian, 1981; Murphy, 1970). Astfel, indivizii care au ingerat sulfat de zinc au prezentat o ușoară perturbare a metabolismului lipidic, prin reducerea nivelului de colesterol HDL seric la ingestia unor doze zilnice de 2,3 mg Zn / Kg corp / zi timp de 5 – 6 zile și prin scăderea nivelului de adrenal cortisol în plasmă după ingestia unei doze de 25 sau 37,5 sau 50 mg Zn (Hooper et al, 1980; Brandao-Neto et al., 1990).

Așa cum s-a prezentat și anterior, zincul intervine în activitatea mai multor enzime. În acest sens s-au făcut determinări cantitative privind unele enzime serice (tabel 4-13).

Tabel 4-13. Determinarea unor enzime serice după administrare de clorură de zinc

Specificare grup de lucru	Concentrația unor enzime serice (U / L)							
	Transaminaze				n	Fosfataza alcalină	n	Amilaza
	n	ALT	n	AST				
	$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$	
Grup C	10	124,60±29,26	10	148,20±25,41	10	150,00±20,27	10	547,30±45,86
Grup E ₃	10	133,90±45,93	10	151,20±52,61	10	166,60±49,24	10	688,40±173,06**
ΔX_3		+ 9,30		+ 3,00		+ 16,60		+ 141,10
Grup E ₄	10	151,30±69,06	10	137,40±34,50	10	229,12±48,54**	10	725,70±45,22**
ΔX_4		+ 26,70		- 10,80		+ 79,12		+ 178,40

Notă: n – număr animale de experiență; ** P < 0,01.

Dintre enzimele serice s-au determinat două transaminaze serice și anume transaminaza ALT care este alanil-amino-transferaza și transaminaza AST care este asparagin-amino-transferaza. Pe lângă aceste două enzime s-a mai determinat fosfataza alcalină (notată și ALP) și amilaza serică. Prezentarea sub formă de histogramă se face în figura 4-26 pentru alanil-amino-transferaza, asparagin-amino-transferaza și fosfataza alcalină.

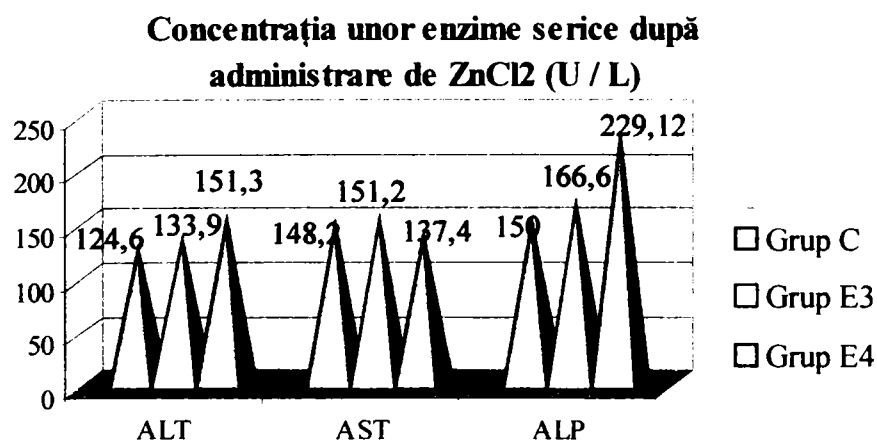


Fig. 4-26. Cuantumul unor transaminaze și fosfatazei alcaline serice după administrarea de ZnCl₂

Alanil-amino-transferaza (ALT) după administrarea prin gavaj de $ZnCl_2$ la șobolani linia Wistar din grupul E_3 suferă o ușoară creștere (cu 9,30 U / L), iar la creșterea dozei de $ZnCl_2$ administrată la grupul experimental E_4 creșterea este mai mare (cu 26,70 U / L). În cazul asparagin-amino-transferazei (AST) se observă o creștere a concentrației (cu 3,00 U / L) la grupul experimental E_3 și o scădere a concentrației (cu 10,80 U / L) la grupul E_4 .

Concentrația fosfatazei alcaline sanguine după gavajul cu soluție de $ZnCl_2$ (dublul RDI pentru Zn) la grupul E_3 există o creștere moderată cu 16,60 U / L, iar la creșterea concentrației de $ZnCl_2$ (cvadruplul RDI pentru Zn) la grupul E_4 se observă o creștere semnificativă a concentrației acestei enzime cu 79,12 U / L.

Figura 4-27 prezintă variația concentrației amilazei serice în cazul grupului la care s-a administrează soluție care conține un exces de zinc la șobolani Wistar.

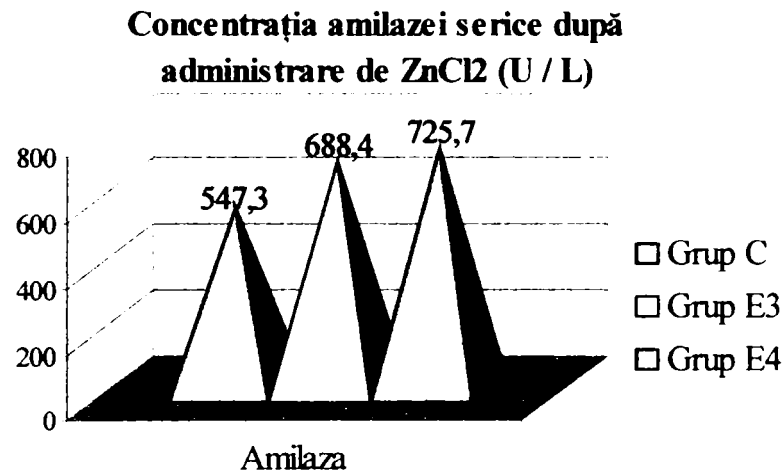


Fig. 4-27. Valoarea amilazei serice la șobolani după administrarea $ZnCl_2$.

Conform datelor prezentate în figura de mai sus se poate observa că administrarea de zinc în exces duce la creșterea semnificativă a concentrației amilazei serice. Astfel, administrarea unei doze de zinc reprezentând dublul RDI – grup E_3 – determină o creștere accentuată a amilazei serice (de 141,10 U / L, adică cu 25,78 % față de grupul de control), iar la administrarea unei doze cvadruplul RDI – grup E_4 – creșterea este semnificativă, dar mai mare decât în cazul E_3 (cu 178,40 U / L, ceea ce reprezintă 32,60 % față de grupul de control).

Date preliminare privind efectele administrării unor doze în exces de mangan și zinc la animale de laborator (șobolani Wistar) au făcut obiectul mai multor lucrări de specialitate la care am fost coautor. Astfel, s-au făcut dozări ale unor enzime serice la șobolani și s-a încercat stabilirea unor interacții metabolice ale manganului sau zincului responsabile pentru modificările apărute (Vincu et al., 2003a).

La oameni toxicitatea acută prin ingestie orală a zincului provoacă grețuri, stare de vomă, crampe abdominale și în unele cazuri sângerări la nivelul stomacului (Moore, 1978; Agency for Toxic Substances and Disease Registry – Toxicological profile for Zinc, 1989). Ingestia de clorură de zinc poate provoca arsuri la nivelul cavității bucale și la nivelul gâtului, stare de vomă, faringite, esofagite, hipocalcemie și o activitate crescută a amilazei care indică existența unei pancreatite (Chobanian, 1981).

În general, modificarea activității unor enzime demonstrează disfuncții ale ficatului întâlnite la muncitori care lucrează în medii poluate cu zinc (Stokinger, 1981; Badawy et al., 1987).

Se cunoaște faptul că între electroliții sanguini există relații sinergice și antagonice, un bioelectrolit putând influența pozitiv sau negativ concentrația sanguină a

altuia. Din aceste considerente s-a procedat și la determinarea unor electroliți sanguini după administrarea unui exces de zinc (Tabel 4-14).

Tabel 4-14. Determinarea unor electroliți serici după administrare de $ZnCl_2$.

Specificare grup de lucru	Concentrația unor electroliți serici									
	n	Na (mg/dL)	n	K (mg/dL)	n	Ca (mg/dL)	n	Mg (mg/dL)	n	Fe (μ g/dL)
		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$
Grup C	10	322,46 \pm 2,02	10	20,50 \pm 3,34	10	10,20 \pm 0,34	10	2,53 \pm 0,58	10	120,40 \pm 27,23
Grup E ₃	10	335,11 \pm 4,06	10	20,97 \pm 10,86	10	9,88 \pm 0,49	10	3,34 \pm 0,87*	10	131,10 \pm 38,44
ΔX_3		+ 12,65		+ 0,47		- 0,32		+ 0,81		+ 10,70
Grup E ₄	10	336,42 \pm 4,49	10	22,46 \pm 4,86	10	10,10 \pm 0,61	10	3,66 \pm 0,50**	10	135,40 \pm 31,28*
ΔX_4		+ 13,96		+ 1,96		- 0,10		+ 1,13		+ 15,00

Notă: n – număr animale de experiență; * P < 0,05; ** P < 0,01.

De asemenea, consecința expunerii orale la oxid de zinc, oleat de zinc și sulfat de zinc a șoarecilor și șobolanilor este apariția unei anemii datorită apariției unor hemoragii intestinale (Fox and Jacobs, 1986; Maita et al., 1981).

În administrarea experimentală efectuată pe șoareci s-au observat și aberații cromosomiale la nivelul celulelor măduvei osoase pe fondul unui aport scăzut de calciu la administrarea unor doze de 650 mg / Kg corp / zi clorură de zinc pe timpul unei luni întregi (Deknudt, 1982). Animalele tratate cu zinc au dezvoltat și o alopecie care se poate să fie un al doilea efect al zincului în procesul de inducere a deficienței de cupru (Mulhern et al., 1986; Agency for Toxic Substances and Disease Registry – Toxicological profile for Zinc, 1989).

Din datele prezentate în tabel se observă că aproape în toate cazurile zincul în exces determină o creștere a valorii concentrațiilor bioelementelor investigate din serul sanguin al șobolanilor Wistar. Aceasta ar putea explica existența unui efect sinergic al zincului cu sodiul, potasiul, magneziul și fierul. Face excepție de la cazul de față calciul, care după creșterea aportului de zinc față de doza recomandată suferă o ușoară depresie. Acest fapt este susținut și de afirmațiile făcute de către Chobanian (1981) care spune că ingestia de clorură de zinc poate determina și apariția hipocalcemiei.

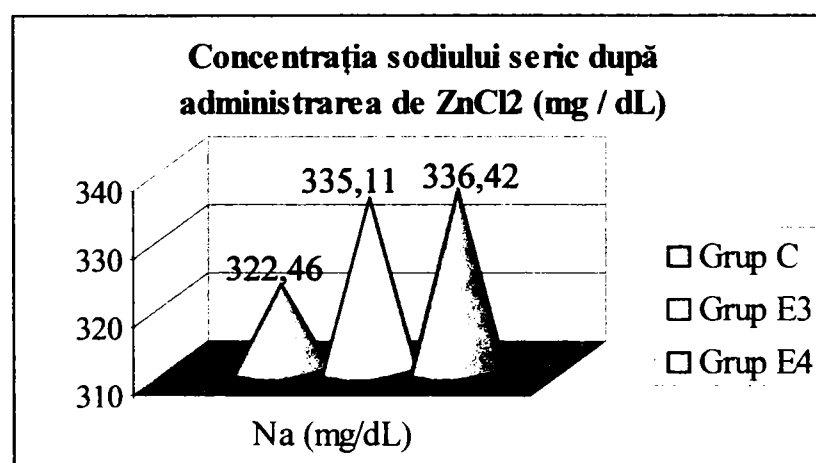


Fig. 4-26. Variația cantumului de sodiu după administrarea unor soluții de $ZnCl_2$

Pentru sodiul luat în studiu concentrația la grupurile experimentale (E₃ și E₄) suferă o ușoară creștere față de grupul de control (C). Astfel, administrarea de zinc dublu RDI la grupul E₃ determină o creștere a concentrației sanguine a sodiului cu 12,65 mg / dL, respectiv o creștere cu 13,96 mg / dL la grupul E₄ față de grupul de control.

Dintre electroliții prezentați se observă că potasiul suferă o creștere moderată la aportul de zinc în exces, deci zincul și fierul acționează sinergic (fig. 4-29). Creșterea cantității potasiului sanguin nu este semnificativă, în primul caz după administrarea de zinc la grupul E₃ concentrația potasiului crește cu 0,47 mg / dL, iar la administrarea de zinc la grupul E₄ creșterea este de 1,96 mg / dL.

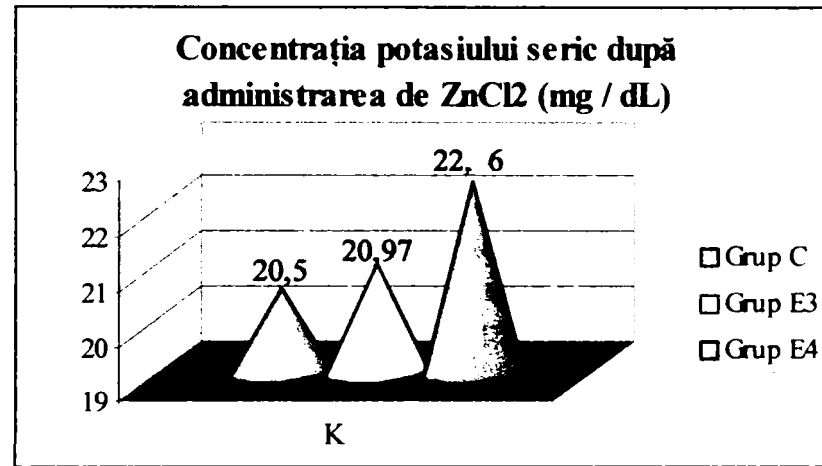


Fig. 4-29. Concentrația potasiului seric la șobolani Wistar după un exces de zinc

În ceea ce privește concentrația fierului din sânge (figura 4-30), la grupul experimental E₃ creșterea valorii fierului este de 10,70 μg / dL, iar la grupul experimental E₄ creșterea este de 15,00 μg / dL față de grupul de control.

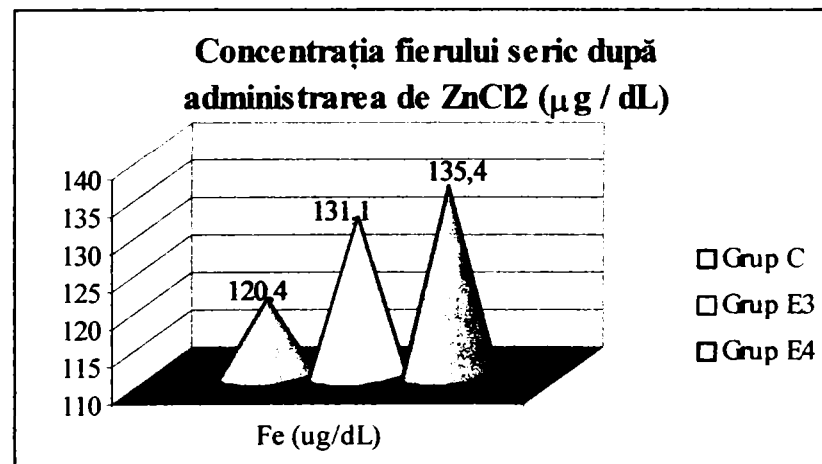


Fig. 4-30. Modificarea concentrației fierului sanguin după administrarea de zinc în exces

Variația cantitatului de calciu și magneziu seric este redată și în figura 4-31. Cu referire la calciu, concentrația acestuia în urma unui exces de zinc scade ușor și anume la grupul E₃ cu 0,32 mg / dL, iar la grupul E₄ cu 0,10 mg / dL. Valoarea magneziului sanguin la șobolani linia Wistar după creșterea dozei de zinc ingerate suferă o creștere semnificativă.

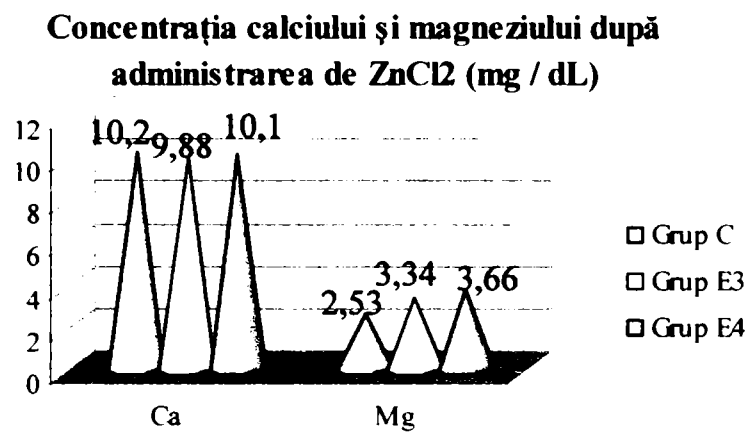


Fig. 4-31. Modificarea concentrației calciului și magneziului seric la șobolani Wistar

La dublarea dozei de zinc ingerate față de RDI concentrația magneziului crește cu 0,81 mg / dL, ceea ce reprezintă 32,02 %. Dacă zincul ingerat este de patru ori RDI la șobolani – prin determinări de magneziu sanguin – se observă că acesta crește cu 1,13 mg / dL, ceea ce reprezintă un procent de 44,66 %.

Diverse cercetări au avut ca scop determinarea influenței conținutului de magneziu din dietă asupra concentrației de magneziu și zinc din serul sanguin, din schelet (femur) și din unele organe (ficat, rinichi, splină și cord). Astfel, în cazul șobolanilor Wistar la care s-a administrat diete cu deficiență de magneziu concentrația magneziului seric a fost de 0,77mMol/L, iar la administrarea unor diete cu aport normal de magneziu, concentrația serică de mangan a fost de 1,04 mMol / L (Krejpcio et al., 2000).

Datele din literatura de specialitate arată că expunerea cronică la zinc duce la anemie hipocromă microcitară asociată cu hipoceruloplasminemie, hipocupremie și la unii indivizi neutropenie (Prasad et al., 1978; United States Environmental Protection Agency, 1984; Hoffman et al., 1988; Broun et al., 1990). Dozele de referință (RfD – Refferences Doses) pentru expunerea cronică la zinc sunt cele date de către United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA), iar RfD atât pentru expunerile cronice cât și pentru expunerile subcronice este de 0,2 mg / Kg corp / zi, doză care se bazează pe date experimentale clinice care demonstrează că zincul induce deficiențe de cupru și anemie la pacienții care ingeră zilnic sulfat de zinc pentru tratamentul unei forme de anemie (sickle cell anemia) – U.S. EPA, 1992.

De asemenea, la șoarecii care au primit în dietă o concentrație de 2500 ppm zinc (sub formă de oleat de zinc) s-a observat instalarea unei anemii (Walters and Roe, 1965). La șobolanii care au primit doze de 250 sau de 500 mg Zn / kg corp / zi (sub formă de carbonat de zinc) timp de 39 săptămâni s-a raportat apariția aceluiași simptome de anemie ca și în cazul anterior (Sutton și Nelson, 1937). Un alt studiu la care șobolani de experiență au ingerat doze mai mari decât 25,5 mg Zn / kg corp / zi (sub formă de acetat de zinc) în apa de băut timp de 47 săptămâni nu au prezentat nici un efect de toxicitate și nici instalarea anemiei (Drinker et al., 1927). În cazul ingestiei în dietă de 250 mg Zn / Kg corp / zi (sub formă de oxid de zinc) sau pulberi de zinc în concentrație de 125 mg Zn / Kg corp / zi șobolanii supuși experimentului nu au prezentat anemie și nici un efect de toxicitate pe parcursul a trei generații, observându-se doar o ușoară scădere în rata de creștere la șobolanii cu doze de 250 mg Zn / Kg corp per zi (Heller and Burke, 1927 – citat de Opresko, 1992).

Diverși autori au făcut determinări cu privire la cantumul de zinc și cupru din sânge prelevat de la bovine. Astfel, valorile normale ale concentrației de cupru plasmatic la bovine a fost de 12,5 – 18,0 $\mu\text{Mol} / \text{L}$ (Illek, 1989 – citat de Baraka et al., 1999) și 10,71 – 18,36 $\mu\text{Mol} / \text{L}$ (Faye și Shekhwat, 1992 – citat de Baraka et al., 1999).

Valorile normale ale concentrației cuprului din sânge la bovine sănătoase a variat între 12,0 – 16,0 $\mu\text{Mol} / \text{L}$ (Illek, 1989 – citat de Baraka et al., 1999) și 7,9 – 23,6 $\mu\text{Mol} / \text{L}$ (Bhathena și Recant, 1987 – citat de Baraka et al., 1999).

Deficiența de zinc a fost subiectul unui studiu realizat pe șobolani de 35 zile, respectiv de 300 de zile. Furajarea animalelor din cele două grupuri experimentale a fost făcută cu o dietă deficientă în zinc și anume cu doar 1 ppm Zn, iar grupul de control a fost furajat cu o dietă la care s-a făcut o suplimentare cu 50 ppm Zn. Pe parcursul experimentului s-a urmărit statusul fiziologic al șobolanilor din grupele experimentale comparativ cu grupul de control, fiind evaluată și comportarea acestora. La animalele din grupele cu deficiență de zinc s-a observat consumarea unei cantități mai mici de furaje, reducerea greutății corporale, precum și scăderea semnificativă a concentrației de zinc plasmatic. La șobolanii cu vârsta de 300 de zile și la care s-a administrat dietă deficientă în zinc s-a observat o înălțare mult mai redusă comparativ cu controlul, iar șobolanii tineri din grupul experimental au prezentat deficiențe de creștere și dezvoltare (Gordon et al., 1982).

O imagine de ansamblu privind acțiunea zincului asupra metabolismului compușilor azotați neproteici, a funcției hepatice și renale este oferit de statusul homeostaziei acidului uric, creatininei și azotului ureic (sau ureei ca și metabolit rezultat din ciclul ureogenezic). În acest scop s-au făcut investigații asupra metaboliților amintiți. În tabelul 4-15 sunt prezentate concentrațiile acidului uric, creatininei și azotului ureic.

Tabel 4-15. Determinarea acidului uric, creatininei și azotului ureic seric după administrare de clorură de zinc

Specificare grup de lucru	Concentrația unor compuși azotați neproteici (mg/dL ser)					
	n	Acid uric	n	Creatinină	n	Azot ureic
		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$		$\bar{X} \pm DS$
Grup C	10	2,78±0,96	10	0,54±0,07	10	29,50±4,22
Grup E ₃	10	3,53±1,91*	10	0,57±0,15	10	33,62±21,27
ΔX_3		+ 0,75		+ 0,03		+ 4,12
Grup E ₄	10	3,61±1,37*	10	0,60±0,06	10	36,00±4,22*
ΔX_4		+ 0,83		+ 0,06		+ 6,50

Notă: n – număr animale de experiență; * P < 0,05.

Conform datelor prezentate în tabel se poate afirma că o creștere a dozei de zinc ingerată determină și o creștere a acestor parametrii serici, cu excepția creatininei pentru grupul E₃. Acest fapt conferă date referitoare și la statusul funcțional al aparatului reno-urinar.

În figura 4-32 este prezentată sub formă de histogramă variația concentrației acidului uric și cantumul creatininei, iar în figura 4-33 variația concentrației azotului ureic din ser sanguin, din probele prelevate de la șobolani linia Wistar după administrarea de zinc în exces.

**Concentrația acidului uric și a creatininei
după administrarea de ZnCl₂ (mg / dL)**

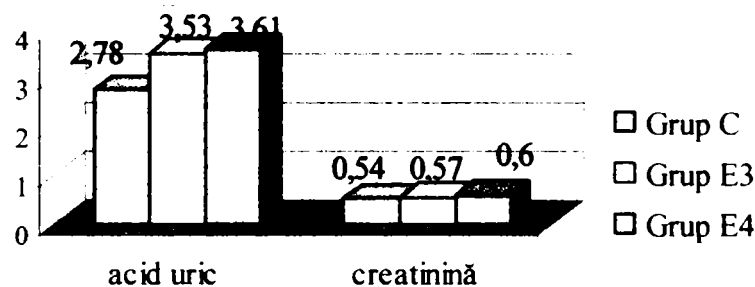


Fig. 4-32. Cuanțumul acidului uric și creatininei după un exces de zinc

Din valorile prezentate grafic se poate observa că după administrarea prin gavaj a unei doze de zinc în exces se produce o creștere a concentrației acidului uric și creatininei. Astfel, la administrarea pe cale orală de zinc dublul RDI concentrația acidului uric crește cu 0,75 mg / dL, ceea ce reprezintă cca 26,98 %, iar la administrarea unei doze de zinc cvadruplul RDI creșterea este de 0,83 mg / dL, ceea ce reprezintă 29,86 % (variația concentrației acidului uric s-a făcut comparativ cu grupul de control). Concentrația creatininei crește la grupul experimental E₃ cu 0,03 mg / dL, iar la grupul experimental E₄ cu 0,06 mg / dL comparativ cu grupul de control.

**Concentrația azotului ureic seric după
administrare de ZnCl₂ (mg / dL)**

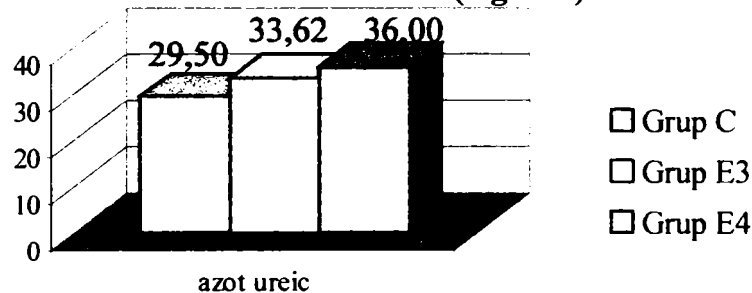


Fig. 4-33. Valoarea azotului ureic la grupurile experimentale față de grupul de control după administrare de ZnCl₂

Conform histogramei prezentată mai sus se observă că valoarea concentrației azotului ureic după administrarea prin gavaj de zinc în exces la grupul E₃ – dublul RDI pentru Zn – creștere cu 4,12 mg / dL, după care la un aport de zinc cvadruplu RDI – grupul E₄ concentrația azotului ureic crește cu 6,50 mg / dL.

În tabelul 4-16 se prezintă concentrația bilirubinei, care este un parametru al funcției hepatice, interesând metabolismul hemoglobinei și care ar putea să arate o posibilă implicarea a zincului.

Bilirubina este un compus azotat tetrapirolic și se formează în cadrul metabolismului proteic, din hemoglobină. În acest sens este interesant de evaluat și efectul zincului în exces asupra concentrației fierului (știindu-se că fierul este constituent al hemoglobinei). De asemenea, zincul este efector biochimic intervenind

în activitatea unor enzime care ar putea fi responsabil de creșterea moderată a concentrației bilirubinei serice după administrarea prin gavaj a soluției de $ZnCl_2$.

Tabel 4-16. Determinarea bilirubinei totale serică după administrare de clorură de zinc

Specificare grup de lucru	n	Bilirubină totală (mg / dL)
		$\bar{X} \pm DS$
Grup C	10	0,13 ± 0,05
Grup E ₃	10	0,15 ± 0,04
ΔX_3		+ 0,02
Grup E ₄	10	0,16 ± 0,06
ΔX_4		+ 0,03

Notă: n – număr animale de experiență

Se observă că aportul de zinc în exces determină creșterea nesemnificativă a parametrilor biochimici din serul sanguin. În figura 4-34 se poate observa variația bilirubinei totale după creșterea concentrației de zinc administrate prin gavaj.

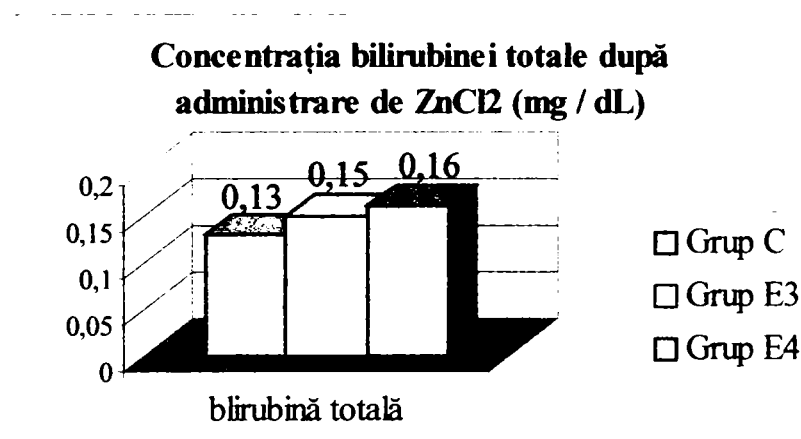


Fig. 4-34. Modificarea cantumului de bilirubină totală la grupurile E₃ și E₄ față de grupul de control

Și la nivel hepatic se observă că există modificări datorate creșterii ingestiei de zinc față de valoarea recomandată. Astfel, la șobolani linia Wistar după administrarea prin gavaj a unei soluții de clorură de zinc – dublul RDI pentru Zn – grupul E₃ se produce creșterea a bilirubinei totale cu 0,02 mg / dL, ceea ce reprezintă un procent de 15,38%. Comparativ, la administrarea de soluție de clorură de zinc – cvadruplul RDI pentru Zn – grupul E₄ concentrația bilirubinei totale crește față de grupul de control cu 0,03 mg / dL, ceea ce reprezintă cca 23,08 %.

4.3.3. Efecte induse de mangan și zinc asupra unor biometale și metale cu potențial toxicogen din țesut renal

Pentru evaluarea retenției unor biometale și metale cu potențial toxicogen în țesut renal după administrarea unor doze dublul RDI sau cvadruplul RDI de mangan sau zinc s-a procedat la excizia și prelevarea rinichilor. Aceasta s-a făcut din considerentul că rinichiul este una din căile de eliminare a biometalelor și metalelor cu potențial toxicogen din organismul animalelor de experiență. Eliminarea unor cantități variabile de substanțe minerale are ca efect final menținerea unei homeostaziei interne și prevenirea perturbării unor funcții metabolice datorate unei supradoze de mangan sau zinc.

După excizia și prelevarea de rinichi de la șobolanii linia Wistar s-au făcut determinări cantitative de biometale: cupru, zinc, mangan și metale cu potențial toxicogen: crom, plumb și aluminiu. Protocolul de lucru a fost identic cu protocolul prezentat în Cap. 4.2.

4.3.3.1. Evaluarea efectelor induse de mangan

Cu referire la concentrația biometalelor studiate după administrarea unor doze de mangan duble față de RDI, datele analitice se prezintă în tabelul 4-17.

Tabel 4-17. Concentrația unor biometale din probe de rinichi după administrarea de $MnCl_2$

Specificare grup de lucru	Biometale ($\mu g / g$)					
	n	Cu $\bar{X} \pm DS$	n	Zn $\bar{X} \pm DS$	n	Mn $\bar{X} \pm DS$
Grup C	10	5,00±0,58	10	19,64±3,49	10	0,68±0,24
Grup E ₁	10	3,41±1,51	10	21,01±1,98	10	0,79±0,32
ΔX_1		- 1,59		+ 1,37		+ 0,11
Grup E ₂	10	2,69±0,92**	10	21,19±2,83	10	0,87±0,08*
ΔX_2		- 2,31		+ 1,55		+ 0,19

Notă: n – număr animale de experiență; * P < 0,05; ** P < 0,01.

Datele din tabelul prezentat anterior se redau sub formă de histogramă cu concentrațiile biometalelor zinc și cupru din rinichi prelevați de la șobolani Wistar (fig. 4-35).

Deficiența de mangan la șobolani a fost studiată prin administrarea unei diete fără mangan timp de 3 săptămâni, determină o creștere semnificativă de mangan la nivelul unor organe: creier, cord, splină, testicule, precum și la nivelul unor țesuturi: mușchiul femural și tibia (Yokoi, 1991).

Un alt studiu experimental a demonstrat faptul că s-au găsit concentrații semnificativ scăzute de mangan în mușchiul cordului la porcii care au primit diete bogate în mangan față de porcii care au primit diete cu concentrații scăzute de mangan (Miller, 2000).

Concentrația de cupru și zinc din rinichi după administrarea de MnCl₂ (μg / g)

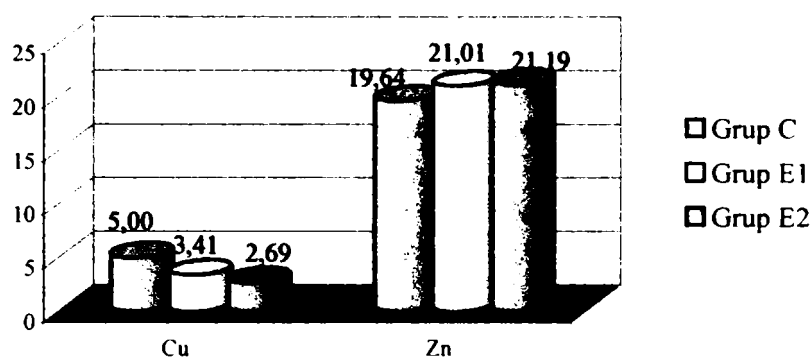


Fig. 4-35. Variația cantumului de zinc și mangan după administrarea de clorură de mangan

În ceea ce privește cantumul cuprului din rinichii prelevați de la șobolani se produce o scădere moderată. Astfel, la administrarea de mangan dublul RDI pentru Mn – grup E₁ – scade concentrația zincului cu 1,59 μg/g, iar la administrarea de mangan cvadruplul RDI pentru Mn – grupul E₂ – concentrația cuprului din rinichi scade cu 2,31 μg/g.

Concentrația zincului la grupul experimental E₁ prezintă o ușoară creștere comparativ cu grupul de control, valoarea diferenței dintre cantumul de zinc la grupul C și grupul E₁ fiind de 1,37 μg/g. După administrarea de mangan cvadruplul RDI – grupul E₂ concentrația zincului crește cu 1,55 μg/g comparativ cu grupul de control C.

Figura 4-36 prezintă modificarea cantumul de mangan din rinichi după administrarea de mangan în exces la șobolani.

Concentrația manganului din rinichi după administrarea de MnCl₂ (μg / g)

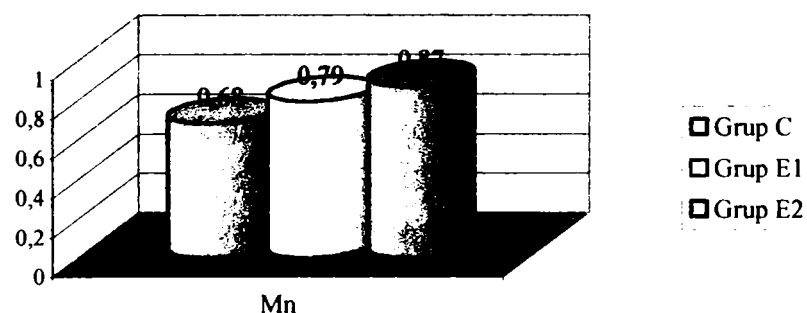


Fig. 4-36. Variația concentrației de mangan în rinichi la administrarea de mangan în exces

După administrarea de mangan în exces cantumul manganului din rinichii prelevați de la șobolani Wistar a crescut la grupul E₁ comparativ cu grupul de control. La administrarea de mangan cvadruplu RDI (grupul E₂) concentrația de mangan din rinichi a crescut comparativ cu grupul de control C și grupul E₁.

Literatura de specialitate prezintă un studiu referitor la deficiența de mangan indusă (prin administrarea unor diete sărace în mangan) la șobolani pe parcursul a 8 săptămâni a

avut ca rezultat creșterea cantumului de mangan la nivel de hipotalamus (Schulka A. și Schulka G.S., 1989).

Referitor la toxicitatea manganului s-a arătat că etanolul determină o accentuare a toxicității manganului pentru organismul uman. Cercetările efectuate pe șobolani de experiență la care s-a administrat în apa de băut etanol și clorură de mangan au arătat că în creier și ficat a crescut cantumului de mangan comparativ cu administrarea de apă de băut cu clorură de mangan (US Department of Health and Human Services, 1997). Efectul manganului asupra ficatului și activității enzimelor serice pare să fie sinergic (Shukla et al., 1978).

Administrarea de mangan sub formă de dioxid de mangan (MnO_2) în concentrație de 24,3 mg Mn / Kg prin gavaj, o singură dată pe săptămână, timp de patru săptămâni, nu a determinat creșterea concentrației de mangan în sânge sau țesutul cerebral. Concentrația de mangan la nivelul ficatului nu a fost influențată de forma sub care a fost administrat manganul, respectiv clorură de mangan sau dioxid de mangan. Clorura de mangan însă este mult mai solubilă în mediul apos comparativ cu dioxidul de mangan (Roels et al., 1997).

În continuare în tabelul 4-18 se prezintă cantumul unor metale cu potențial toxicogen în probele de rinichi prelevate de la șobolani Wistar.

Tabel 4-18. Concentrația unor metale cu potențial toxicogen din probele de rinichi după administrarea de $MnCl_2$

Specificare grup de lucru	Metale cu potențial toxicogen ($\mu g / g$)					
	n	Cr $\bar{X} \pm DS$	n	Pb $\bar{X} \pm DS$	n	Al $\bar{X} \pm DS$
Grup C	10	0,41±0,04	10	0,16±0,07	10	5,13±1,61
Grup E ₁	10	0,49±0,25	10	0,29±0,12*	10	6,09±1,50
ΔX_1		+ 0,08		+ 0,13		+ 0,96
Grup E ₂	10	urme	10	0,48±0,16**	10	7,04±1,06**
ΔX_2				+ 0,32		+ 1,91

Notă: n – număr animale de experiență; * P < 0,05; ** P < 0,01.

În continuare se prezintă histograma cu modificarea concentrației de crom și plumb din probele de rinichi de la șobolani după un exces de mangan (fig. 4-37).

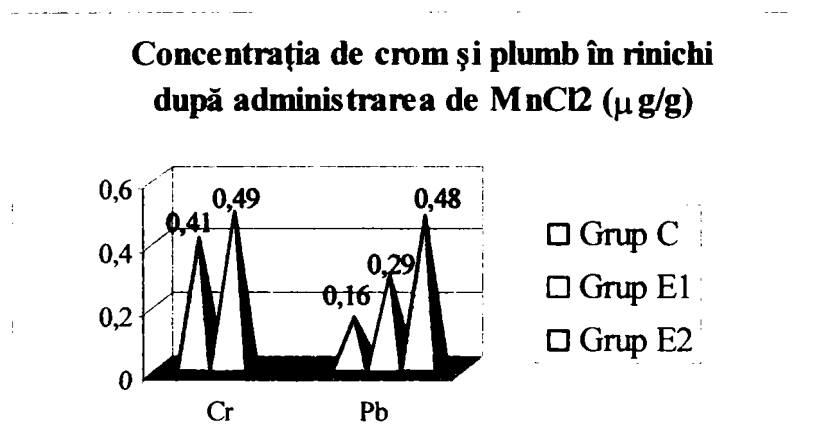


Fig. 4-37. Concentrația de crom și plumb în probele de rinichi după administrarea de $MnCl_2$

Concentrația cromului din rinichi după administrarea de mangan în cantum reprezentând dublul RDI pentru Mn (grupul E₁) crește cu 0,08 μg/g, iar la administrarea de mangan în cantum cvadruplu RDI pentru Mn (grupul E₂) cromul este prezent doar în urme – decelarea cantitativă nefiind posibilă cu metoda aplicată.

În cazul concentrației de plumb la grupul E₁ se produce o creștere foarte mare cu 181,25 % față de grupul de control C. La grupul E₂ creșterea concentrației plumbului este mai mare decât în cazul grupului E₁, fiind mai mare și față de grupul de control cu 300,00 %.

Creșterea cantumului plumbului la grupurile experimentale E₁ și E₂ poate fi explicată de legarea manganului de albuminele serice și, în general, de proteinele circulante.

Datorită ordinului de mărime diferit între concentrația cromului, plumbului și concentrația aluminiului din rinichi de șobolani Wistar prezentarea histogramei cu modificarea cantumului de aluminiu se prezintă în figura 4-38.

Concentrația aluminiului din rinichi după administrarea de MnCl₂ (μg/g)

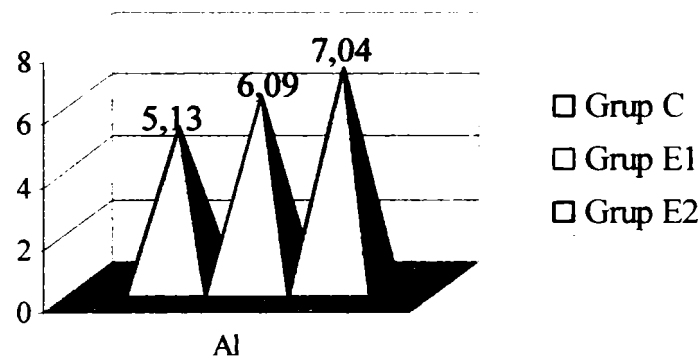


Fig. 4-38. Variația concentrația de aluminiu din rinichi după administrarea de mangan în exces la șobolani Wistar

Cu privire la modificarea cantumului de aluminiu din rinichii prelevați de la șobolani se observă că la grupul E₁ creșterea este de 0,96 μg / g comparativ cu grupul de control C. La grupul E₂ concentrația de aluminiu din rinichi crește (mai mult decât la grupul E₁) cu 1,91 μg / g față de grupul control C.

4.3.3.2. Evaluarea efectelor induse de zinc

Analog cu studiul realizat pe șobolani linia Wistar privind recoltările de sânge, s-a procedat la prelevarea de rinichi, conform protocolului de lucru prezentat în Cap. 4.2. Experimentele în acest caz s-au efectuat cu ZnCl₂, urmărindu-se de asemenea, distribuția biometalelor cupru, mangan și zinc, precum și a metalelor cu potențial toxicogen crom, plumb și aluminiu. Probele au fost ulterior supuse determinărilor analitice, când prin spectrofotometrie de absorbție atomică s-a determinat concentrația unor biometale și unele metale cu potențial toxicogen.

Tabelul 4-19 reprezintă valoarea concentrațiilor unor biominerale prezente în probele de rinichi prelevate de la șobolani linia Wistar după administrarea de zinc în exces la grupurile experimentale E₃ și E₄.

Tabel 4-19. Concentrația unor biometale din rinichi după administrarea de ZnCl₂

Specificare Grup de lucru	Biometale (μg / g)					
	n	Cu $\bar{X} \pm DS$	n	Mn $\bar{X} \pm DS$	n	Zn $\bar{X} \pm DS$
Grup C	10	5,00±0,58	10	0,68±0,24	10	19,64±3,49
Grup E ₃	10	3,27±0,74	10	1,22±0,83*	10	16,15±2,38
ΔX_3		- 1,73		+ 0,54		- 3,49
Grup E ₄	10	3,08±0,81*	10	1,41±0,79**	10	15,63±2,83*
ΔX_4		- 1,92		+ 0,73		- 4,01

Notă: n – număr animale de experiență; * P < 0,05; ** P < 0,01.

Figura 4-39 prezintă modificarea cunatumului de cupru și mangan în rinichi prelevați de la șobolani Wistar din grupurile experimentale E₃ și E₄ comparativ cu grupul de control C.

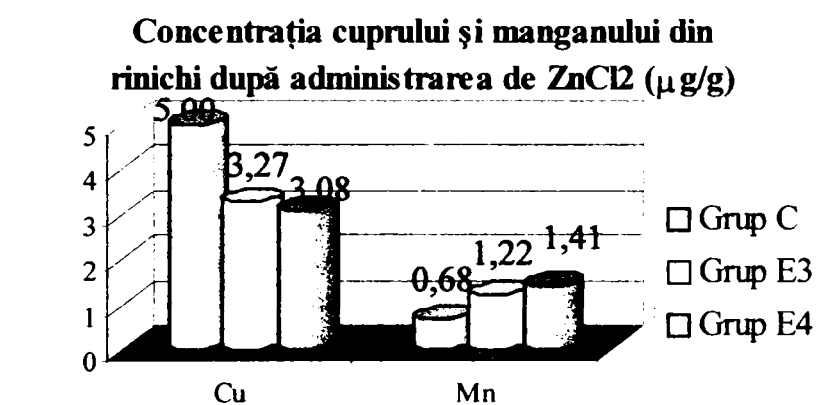


Fig. 4-39. Concentrația unor biometale în rinichi de șobolani după administrarea de zinc în exces

Din prezentarea grafică realizată în figura de mai sus, se observă că în cazul cuprului, concentrația acestuia scade semnificativ la grupele experimentale E₃ și E₄ comparativ cu grupul de control C. Astfel, la grupul E₃ concentrația de cupru scade cu 1,73 μg/g, iar la grupul E₄ cu 1,92 μg/g față de grupul de control C.

Comparativ cu cuprul din rinichi, concentrația manganului la grupele experimentale crește. Astfel, la grupul E₃ cuantumul manganului crește cu 0,54 μg/g, iar la grupul experimental E₄ manganul crește cu 0,73 μg/g.

Un studiu realizat pe șobolani Sprague-Dawley a urmărit biodisponibilitatea cuprului organic sub forma a două suplimente alimentare comparativ cu sulfatul de cupru. De asemenea, s-a urmărit efectul unor concentrații mari de zinc asupra absorbției cuprului provenit din diverse surse. Astfel, administrarea unor suplimente alimentare cu cupru induce creșterea concentrației de cupru din ficat, splină și cord. Suplimentarea dietei cu 5 ppm cupru a determinat variații ale concentrației de cupru din ficat astfel: ficat 12,04 ppm; splină 4,91 ppm; cord 22,01 ppm; rinichi 27,18 ppm. La administrarea unei diete care conține 5 ppm Cu și 1000 ppm Zn concentrația cuprului

în unele organe a variat astfel: ficat 11,96 ppm; splină 4,46 ppm; cord 21,13 ppm; rinichi 26,92 ppm (Hemken et al., 1999).

Figura 4-40 prezintă sub formă de histogramă variația concentrației zincului din rinichi de șobolani linia Wistar după administrarea prin gavaj a unui exces de zinc.

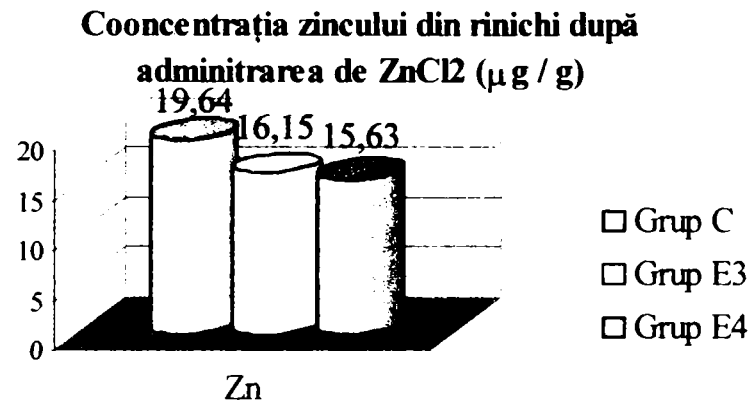


Fig. 4-40. Cuanțumul zincului în rinichi după administrarea prin gavaj a unui exces de zinc

Similar, și în cazul cuprului, concentrația de zinc din rinichi scade după un exces de zinc. Astfel, la grupul experimental E₃ concentrația scade cu 3,49 μg/g, iar la grupul experimental E₄ scade cu 4,01 μg/g comparativ cu grupul de control.

Urmărind unele aspecte privind suplimentarea dietei la șobolani (raportată la Kg furaj) cu 15 ppm cupru a determinat variații ale concentrației de cupru din ficat astfel: ficat 12,33 ppm; splină 5,02 ppm; cord 22,96 ppm; rinichi 27,71 ppm. La administrarea unei diete care conține 15 ppm Cu și 1000 ppm Zn concentrația cuprului în unele organe a variat astfel: ficat 11,78 ppm; splină 5,21 ppm; cord 22,79 ppm; rinichi 36,01 ppm (Hemken et al., 1999).

De asemenea, similar cu studiul anterior, dar la suplimentarea dietei cu 5 ppm cupru (raportată la Kg furaj) a urmărit variația concentrației de zinc din organe. Cuanțumul de zinc a fost: ficat 87,21 ppm; splină 86,03 ppm; cord 69,01 ppm; rinichi 100,83 ppm. La administrarea în dietă a 5 ppm cupru și 1000 ppm zinc concentrația de zinc din organe a prezentat următoarele modificări: ficat 98,09 ppm; splină 87,77 ppm; cord 92,21 ppm; rinichi 120,49 ppm. La administrarea de cupru în dieta șobolanilor în concentrație de 15 ppm variația concentrației de zinc din organe a fost: ficat 86,06 ppm; splină 85,07 ppm; cord 68,80 ppm; rinichi 105,33 ppm. În cazul în care s-a administrat cupru în concentrații mai mari, și anume 15 ppm asociat cu 1000 ppm zinc concentrația de zinc din unele organe a fost: ficat 92,14 ppm; splină 86,45 ppm; cord 92,93 ppm; rinichi 118,15 ppm (Hemken et al., 1999).

Există cercetări care au avut ca scop determinarea influenței conținutului de magneziu din dietă asupra concentrației de magneziu și zinc din schelet (femur) și din unele organe (ficat, rinichi, splină și cord). Astfel, în cazul șobolanilor Wistar la care s-a administrat diete cu deficiență de magneziu concentrația magneziului și zincului din ficat a fost de 283,7 μg/g Mg greutate umedă, respectiv 43,57 μg/g greutate umedă Zn; în splină 206,07 μg/g greutate umedă Mg, respectiv 22,47 μg/g greutate umedă Zn; în rinichi 158,47 μg/g greutate umedă Mg, respectiv 25,47 μg/g greutate umedă Zn; iar în cord 237,27 μg/g greutate umedă Mg, respectiv 18,87 μg/g greutate umedă Zn; iar în femur 0,92 μg/g Mg greutate uscată și 0,137 μg/g Zn greutate uscată (Krejpcio et al., 2000).

Cadmiu influențează concentrația unor biometale la nivel de țesut. Studiul experimental care a demonstrat acest fapt a fost realizat în Japonia pe șoareci – femele, la care s-a administrat intravenos cadmiu sub formă de suspensie sau sub formă de soluție. Suspensia a fost preparată prin adăugarea de soluție de CdCl_2 în soluție de NaHCO_3 , iar cadmiul sub formă de soluție a fost soluție de CdCl_2 . Femelele la care s-a injectat i.v. 0,9 mg / Kg cadmiu în suspensie au prezentat o concentrație constantă de cadmiu în ficat la câteva ore după administrare, dar care a crescut progresiv în rinichi și a prezentat o creștere tranzitorie în splină. De asemenea, s-a înregistrat o apreciere tranzitorie a concentrației de zinc și calciu în ficat și de calciu în splină, iar cantumul fierului din splină a rămas scăzut după administrarea de cadmiu în suspensie. În cazul șoarecilor care au primit cadmiu sub formă de soluție, la 3 ore de la administrare s-a observat o concentrație constantă de cadmiu în ficat, rinichi și splină. S-a constatat că cea mai mare cantitate de cadmiu s-a regăsit sub formă de metalotioneină (Maitani și Suzuki, 1982).

Modificarea cantumului unor metale cu potențial toxicogen din probele de rinichi de la șobolani la care s-a administrat zinc la grupurile experimentale E3 și E4 comparativ cu grupul de control C, este redată în tabelul 4-20.

Tabel 4-20. Concentrația unor metale cu potențial toxicogen din probele de rinichi după administrarea de ZnCl_2

Specificare grup de lucru	Metale cu potențial toxicogen ($\mu\text{g} / \text{g}$)					
	n	Cr $\bar{X} \pm \text{DS}$	n	Pb $\bar{X} \pm \text{DS}$	n	Al $\bar{X} \pm \text{DS}$
Grup C	10	0,41±0,04	10	0,16±0,07	10	5,13±1,61
Grup E ₃	10	0,45±0,15	10	0,25±0,03	10	5,24±1,53
ΔX_3		+ 0,04		+ 0,09		+ 0,11
Grup E ₄	10	0,59±0,19*	10	0,44±0,18**	10	6,22±2,79*
ΔX_4		+ 0,18		+ 0,28		+ 1,09

Notă: n – număr animale de experiență; * P < 0,05; ** P < 0,01.

Prezentarea sub formă de histogramă a modificării concentrației cromului și plumbului în rinichi de șobolani după un exces de zinc se face în figura 4-41.

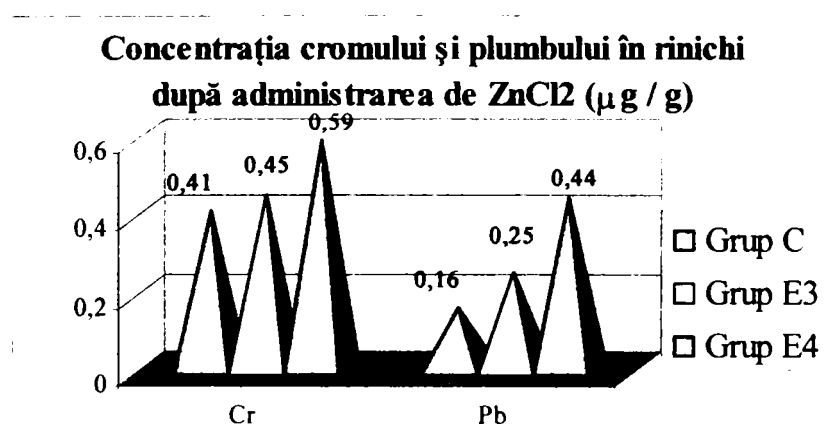


Fig. 4-41. Variația concentrației cromului și plumbului după administrare de ZnCl_2

În ambele cazuri concentrația metalelor crește față de grupul de control. Astfel, administrarea de zinc dublul RDI determină creșterea concentrației de crom din rinichi cu 0,04 $\mu\text{g/g}$, iar la administrarea de zinc cvadruplul RDI concentrația cromului crește cu 0,18 $\mu\text{g/g}$. În cazul plumbului, la grupul E₃ se produce o ușoară apreciere a concentrației, doar cu 0,01 $\mu\text{g/g}$, dar la grupul E₄ creșterea concentrației este semnificativă, și anume de la 0,16 $\mu\text{g/g}$ pentru control la 0,74 $\mu\text{g/g}$.

Și în acest caz, există o posibilă retenție a zincului prin legarea la albuminele serice sau la alte proteine, ceea ce conduce la “translocarea tisulară” a plumbului. Remarcabil în acest caz este faptul că la doze mai reduse de zinc, cazul grupului E₃, se elimină un quantum de plumb mai mic (valori ne semnificative). Acest fapt poate fi explicat de prezența zincului în anumite metaloenzime în care zincul este constituent.

Figura 4-42 prezintă modificarea quantumului de aluminiu din rinichi la grupele experimentale comparativ cu grupul de control.

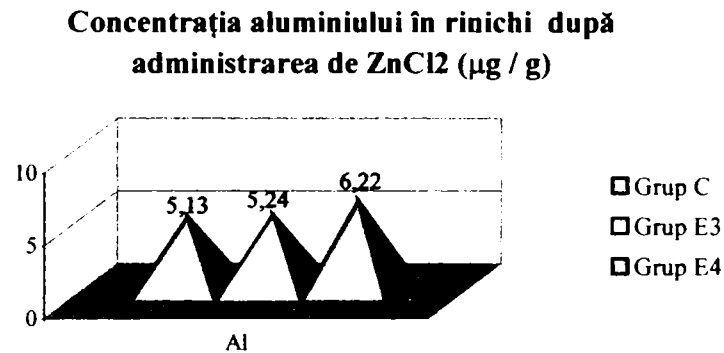


Fig. 4-42. Variația concentrației de aluminiu în rinichi de șobolani Wistar după un exces de zinc

Ca și în cazul cromului și plumbului, și aluminiul se concentrează mai mult în rinichi după administrarea soluției de ZnCl₂. Astfel la administrarea de zinc la grupul E₃ (dublul RDI pentru Zn) concentrația aluminiului crește de la 5,13 $\mu\text{g/g}$ la 5,24 $\mu\text{g/g}$, iar la administrarea de zinc la grupul E₄ (cvadruplul RDI pentru Zn) crește la 6,22 $\mu\text{g/g}$ comparativ cu grupul de control C.

Unele cercetări pe animale de laborator au avut în vedere punerea în evidență a toxicității unor metale cu potențial toxicogen. De asemenea, s-au făcut studii experimentale care au avut ca scop scăderea toxicității unor metale cu potențial toxicogen (e.g.: cadmiului) la administrarea unor doze crescute de alte metale cu potențial toxicogen (e.g.: mercurului).

De asemenea, referitor la studiile “in vitro” asemănătoare cu cele “in vivo” prezentate anterior același colectiv a obținut rezultate similare la administrarea unor doze de 10-30 M și 10-40 M HgCl₂. Astfel, s-a dovedit că există o protecție împotriva cadmiului care în mod obișnuit induce citotoxicitate la culturile de celule tubulare renale.

Cercetări similare care au urmărit vindecarea unor răni s-au realizat și în cazul siliciului administrat sub formă de soluții foarte diluate (Oberbaum et al., 1992).

În cazul folosirii unor suplimente alimentare cu conținut ridicat de zinc (între 10 și 20 mg / Kg corp / zi) cuprul se poate depozita în ficat și astfel poate să determine leziuni ale acestui organ. Acest lucru se poate întâlni și în cazul în care se folosesc suplimente alimentare cu concentrații maxim admise de cupru dar lungi perioade de timp.

În Polonia la căprioare vâdate au fost investigate unele biometale fiind interesant de știut care este conținutul ficatului în unele minerale. Astfel, concentrația medie a unor minerale (exprimată în mg sau g / Kg greutate uscată) din ficatul de căprioară a variat astfel: potasiu 5,888 – 9,732 g / Kg; sodiu 1,293 – 5,774 g / Kg; magneziu 0,939 – 0,768 g / Kg; calciu 1,254 – 0,176 g / Kg; mangan 15,6 – 33,5mg/Kg; zinc 90,4 – 212,2 mg / Kg și cupru 28,5 – 71,2 mg / Kg. Autorii au arătat încă o dată că și animalele sălbatice pot fi considerate surse de hrană (micronutrienți minerali) chiar pentru organismul uman – Rokicki et al., 2000.

În Suedia s-au făcut determinări analitice cu privire la cuantumul de vanadiu din ficat de bovine. Astfel, concentrația medie a vanadiului din ficat a fost de 0,005 mg / Kg ficat (greutate umedă). În unele zone din Suedia s-au făcut fertilizări cu compuși ai vanadiului, iar bovinele crescute în acele zone au prezentat o concentrație medie de vanadiu de 0,008 mg / Kg ficat (greutate umedă). Unele probe de ficat de bovine din aceste zone fertilizate cu vanadiu au avut concentrații de 0,019 mg vanadiu / Kg ficat – greutate umedă – care a fost ulterior stabilită ca “Highest Swedish Reference Value” (Frank și Galgan, 1995).

Un alt studiu experimental a urmărit, la persoane sănătoase din Anglia, determinarea concentrației de aluminiu din anumite organe. Analizele cantitative au arătat că în general, concentrația de aluminiu este sub 0,5 μg/g greutate umedă. În urma acestui experiment s-a determinat și concentrația de aluminiu din ficat fiind 2,6μg/g; în pulmon 18,2μg/g, în noduli limfatici 32,5μg/g și în oase 73,4μg/g cenușă – (Hamilton et al., 1972).

Se cunoaște faptul că un mediu ambiental contaminat cu unul sau mai multe metale determină în mod cert o concentrare a acelor metale în diverse țesuturi din organism. Astfel, în SUA s-au făcut determinări cantitative de cadmiu din ficat și rinichi și metalotioneină din urină, la muncitori expuși cronic la mediu poluat cu cadmiu comparativ cu persoane care nu vin în contact cu medii contaminate cu cadmiu. Datele experimentale au demonstrat că muncitorii care au lucrat timp de 8-29 ani în industrie cu cadmiu, au prezentat concentrații semnificativ mai mari de cadmiu în ficat și rinichi, având și o excreție semnificativ mai mare de metalotioneină în urină comparativ cu persoane care nu au avut contact cu medii poluate cu cadmiu. Experimentul a arătat că există o corelație între cuantumul de cadmiu din ficat și rinichi și cantitatea de metalotioneină excretată prin urină (Chiharu et al., 1981).

Cuantumul unor biometale și metale cu potențial toxicogen din organe prelevate de la animale de experiență (șobolani Wistar) după administrarea unor doze în exces de mangan și zinc a făcut obiectul mai multor studii experimentale. În cadrul abordării problemei legate de prezenta teza de doctorat s-au avut în vedere determinarea cantitativă a unor metale din rinichi și cord. Date preliminare au fost publicate în diverse lucrări de specialitate (Vincu et al., 2002; Vincu et al., 2003b).

Problema relației dintre metalele prezente în diverse alimente abordată în studiile noastre a fost extinsă în cadrul colaborărilor cu Institutul de Sănătate Publică din Timișoara și în relație cu cazuistica urolitiazelor. Cunoscând problemele legate de excesul sau carența unor metale dintr-o anumită zonă geografică se pot institui unele aspecte privind profilaxia (prevenirea urolitiazelor) acestei patologii și metafilaxia urolitiazelor (prevenirea recidivei urolitiazelor) – Daranyi et al., 1998; Drăgan et al., 1999.

Astfel, s-a demonstrat experimental că există diverse tipuri de urolitiază – caracterizate printr-un anumit conținut de metale. Acest fapt se află în strânsă legătură cu mediul ambiental al pacientului și implicit cu distribuția unor metale în sol, apă, aer și alimente și prezintă importanță practică în domeniul medical și în domeniul nutriției umane.

4.4. Efectul oligoelementelor administrate experimental asupra biodisponibilității

Biodisponibilitatea oligoelementelor se află în relație cu procesele de absorbție și cu digestibilitatea acestora. În alimente oligoelementele sunt reprezentate de cantități mici, variind în limite destul de largi. Biodisponibilitatea unui mineral oferă date referitoare la digestia și absorbția aceluși mineral și este utilizat pentru menținerea unui bun status fiziologic sau pentru tratarea unor probleme de ordin patologic.

Atât pentru organismul uman cât și pentru cel animal se utilizează administrarea unor oligoelemente sub diverse forme chimice (formă organică sau anorganică). Astfel, în medicina veterinară se recurge la administrarea unui aport suplimentar de minerale având scop de a obține producții de lapte, carne sau alte produse de abataj de calitate superioară și în cantități mai mari. Un astfel de exemplu ar fi administrarea de compuși chelatici cu conținut de zinc, cupru, mangan, iod și seleniu care a determinat creșterea producției de lapte de vacă (Simek et al., 2000).

4.4.1. Conceptul de biodisponibilitate în relație cu aportul de oligoelemente

Biodisponibilitatea se definește ca fiind relația care se stabilește între substanțe biologic-active și organismul uman în care acced aceste substanțe. Pentru a se putea face o estimare a biodisponibilității în raport cu o anumită substanță se procedează la evaluarea vitezei de absorbție și a cunatumului substanței biologic-active reținute de organism. O altă caracteristică importantă este evaluarea intensității efectului și durata acestuia.

În materie de biodisponibilitate, factorii care influențează oligoelementele au un rol important în relația dintre aportul total de oligoelement și menținerea sa în limite necesare pentru asigurarea stării de sănătate. Principalele variabile care influențează biodisponibilitatea și utilizarea oligoelementelor sunt prezentate în cele ce urmează. O înțelegere generală a mecanismelor de acțiune a factorilor care influențează biodisponibilitatea poate ajuta la identificarea regimurilor alimentare principale și stările fiziologice susceptibile de a modifica riscurile de carență sau de exces în anumite oligoelemente. Se poate prevedea cu destulă eficacitate influența variabilelor alimentare, de mediu și de altă natură asupra acestui risc (Gârban, 1999; Vincu et al., 1999b; Daranyi et al., 2000; Pup et al., 2002).

Având în vedere specificul unei nutriții optime, estimarea biodisponibilității este condiționată de variabile intrinseci sau fiziologice și variabile extrinseci sau nutriționale. Astfel, la aceste două categorii de variabile există aspecte diferite care este necesar să le avem în vedere:

- variabile intrinseci interesează din punct de vedere al:
 - mecanismelor de absorbție în care se urmărește alterarea absorbției, de la vârsta copilăriei la bătrânețe și reglarea homeostatică;
 - interacțiilor metabolice sau funcționale.
- variabile extrinseci la care se urmărește:
 - solubilitatea și dimensiunile moleculelor speciilor portante ale oligoelementelor;
 - aspectele sinergice care cresc mobilitatea elementului; aspectele antagonice care limitează mobilitatea elementului.

De asemenea, la acest nivel se pot discuta problemele specifice bioechivalenței și bioinechivalenței. Pentru a exemplifica acest lucru se amintește existența bioinechivalenței în cazul micronutrienților din grupa compușilor minerali cu conținut de calciu și magneziu care se absorb deficitar dacă acestea se asociază cu alte produse bogate în substanțe antimineralizante.

4.4.2. Biodisponibilitatea și interacțiunea dintre oligoelemente

În cazul studiului metalelor in vivo și vitro se are în vedere faptul că unele metale au efecte sinergice și/sau antagonice între ele sau cu alți compuși din țesuturile vii. Astfel, se prezintă în continuare câteva aspecte legate de interrelațiile dintre metale.

În cazul cadmiului s-a constatat efectul inhibitor al acestuia asupra absorbției fierului și al unor chelatanți puternici cum ar fi EDTA. În ceea ce privește relațiile reciproce dintre fier și cupru, s-a constatat că fiecare dintre aceste metale poate inhiba absorbția celuilalt, deși, spre deosebire de late oligoelemente minerale nu se regăseseră aceleași căi de transport prin mucoasa intestinală. Fierul și cuprul sunt implicați în hemoglobinoză și în general, în hematopoieză (Aspects sanitaires et nutritionnels des oligo-éléments et des éléments en traces, 1997).

Antagoniștii cuprului sunt: molibdenul, sulfatul, fierul, zincul, calciul, cadmiul, argintul, mercurul, plumbul, manganul etc. Carența în cupru atrage după sine o creștere a depozitului de fier și invers. Interrelațiile dintre zinc și cupru constau în faptul că excesul are ca urmare diminuarea depozitului hepatic al cuprului.

O carență de cobalt, respectiv de vitamină B₁₂ la ovine, se corectează prin administrarea de cupru. De asemenea, relațiile dintre cupru și acidul ascorbic sunt antagonice. Molibdenul are în organism un efect antagonic cu cuprul și sulfatul. În ceea ce privește cobaltul, există date care pledează pentru o cale comună de absorbție a cobaltului și a fierului. A fost semnalată o relație antagonică dintre concentrațiile cobaltului și seleniului. Cobaltul și titanul se găsesc în organism în anumite raporturi care pot fi perturbate prin excesul unuia dintre aceștia.

Antagoniștii zincului sunt: calciul, cadmiul, cuprul în exces, proteine vegetale, EDTA și fierul. Carența în magneziu și proteine agravează carența de zinc. Cadmiul este antagonist al zincului în cancer. Cele mai cunoscute, dar nu singurele, și cele mai importante interrelații ale cadmiului sunt cele cu zincul. Ioni de zinc protejează față de efectele toxice ale cadmiului, după cum excesul de cadmiu agravează carența de zinc. Simptomatologia excesului de cadmiu sunt asemănătoare cu cele din carența de zinc. S-a demonstrat că și cadmiul este un puternic antagonist al cuprului.

Calciul are efecte considerabile asupra metabolismului cadmiului. Aportul redus de calciu, indiferent de nivelul fosforului, crește semnificativ absorbția cadmiului și concentrația acestuia în ficat și rinichi. De asemenea, și alte elemente au interrelații cu cadmiul. Astfel cadmiul scade semnificativ concentrația de fier și de mangan din ficat. Seleniul, la rândul lui, protejează organismul de necroză testiculară indusă de cadmiu. Stronțul este capabil să substituie calciul și să provoace modificări similare rahitismului.

Ca oricare dintre oligoelementele din organism, seleniul are numeroase interrelații cu alte elemente, cu care se condiționează reciproc. Relațiile seleniului cu cuprul sunt sinergice. Cobaltul din alimente este corelat negativ cu concentrația de seleniu din ficat și din rinichi. Toxicitatea argintului este contracarată de seleniu. De asemenea, mercurul – ca și cazul cadmiului – reduce excreția respiratorie a seleniului. Plumbul agravează carența în seleniu, iar seleniul reduce toxicitatea plumbului. Arsenul și telurul reduc eliminarea seleniului prin respirație și prin urină. Competiția dintre seleniu și sulf este de mult

cunoscută. Seleniul poate folosi căile metabolice ale sulfurului, competiția manifestându-se chiar în sinteza metioninei. Interrelațiile complexe dintre vitamina E, seleniul, aminoacizii și excesul de grăsimi din rație, deși sunt cunoscute în privința efectelor lor, acestea sunt mai bine elucidate. Antioxidanții au în general un efect de reducere a consumului ("economisire") în organism atât pentru seleniu, cât și pentru vitamina E. De asemenea, interrelații există și între seleniu și acidul ascorbic. La om există o relație stabilită între conținutul de seleniu din alimente și incidența cariilor dentare, atunci când copii consumă cantități mici de seleniu în perioada formării dinților.

Ionul de potasiu este antagonistul ionilor de natriu și calciu. În menținerea integrității funcționale a sistemului nervos și a membranei celulare, ionul de calciu se găsește în antagonism cu ionii de calciu și potasiu, iar rubidiul imită acțiunea potasiului și îl înlocuiește.

Efectul protectiv al cuprului în procesul de oxidare a glicozaminoglicanilor este discutat luând în considerare structura variată și proprietățile acestora. De asemenea, în acest caz se are în vedere și capacitatea de interacție cu diferite regiuni hidrofobice ale lipoproteinelor cu densitate scăzută (LDL) care este confirmată prin măsurarea cineticii fluorescenței LDL-triptofanului (Volpi și Tarugi, 2001).

Biodisponibilitatea micronutrienților poate fi mărită fie prin mai multe procedee. Unul dintre acestea ar fi creșterea cantității de substanțe nutritive cu care se tratează plantele care îmbunătățește absorbția și modul de utilizare al micronutrienților. O altă metodă de mărire a biodisponibilității micronutrienților minerali ar fi scăderea cantității de substanțe antinutritive, în acest caz antimineralizante, care inhibă absorbția micronutrienților. Flosirea izotopilor stabili sau radioactivi care ar putea fi încorporați intrinsec în părțile edibile ale plantei pe parcursul creșterii și dezvoltării acesteia, demonstrează creșterea biodisponibilității mineralelor. Astfel, mărire cantității de nutrienți pentru plante va determina obținerea de plante bogate în oligoelemente cu biodisponibilitate ridicată și va contribui asigurarea unei stări nutriționale benefică pentru organismul uman (William, 2003).

4.4.3. Interacțiunile care limitează mobilitatea oligoelementelor metalice

Cercetările experimentale au demonstrat existența unor substanțe care interferează cu mobilitatea oligoelementelor. Astfel, substanțele care intervin în mecanismul de acțiune al unor oligoelemente în organism se regăsesc sub denumirea de substanțe antimineralizante. Din această categorie fac parte acidul oxalic și acidul fitic (care limitează substanțele minerale cationice), precum și factorii goitrogeni (care intervin în sinteza hormonilor tiroidieni).

În unele produse alimentare există acid oxalic care poate insolubiliza o parte din calciu și magneziu. Astfel se formează oxalat de calciu, respectiv oxalat de magneziu – care reduce absorbția celor două minerale la nivel de organism. Cu cât concentrația de acid oxalic dintr-un aliment depășește concentrația calciului, cu atât efectul antimineralizant este mai puternic (2,25 mg acid oxalic complexează 1 mg calciu).

Ca urmare, folosirea abuzivă a produselor alimentare bogate în acid oxalic (spanac, cacao) este necesar să se facă cu discernământ, mai ales în cazul alimentației copiilor sau persoanelor cu hipomineraloze.

În urmă cu aproximativ 30 de ani s-a presupus pentru prima oară că alimentele pe bază de cereale și leguminoase bogate în fitați (hexafosfat de inozitol) sunt potențiali

antagoniști ai zincului și fierului. Antagonismul nu este atribuit doar formării fitatului de zinc și fier. De fapt, interacțiile alimentare care implică fitații pot inhiba utilizarea oricărui oligoelement, caz în care diferă doar mecanismele. Studii recente prezintă acțiunea variabilelor care modifică la om puterea fitaților ca antagoniști ai oligoelementelor. Observația că rapoarte molare de tipul fitați/zinc mai mari de 15 scad rata de creștere la șobolani, putând fi aplicată și la om.

Calciul alimentar este un mineral implicat în antagonismului fitatului, aparent datorită formării în cursul digestiei a fitatului de calciu sau zinc. Un regim alimentar care are un raport $\text{Ca} \times \text{fitați} / \text{Zn}$ mai mare de 150 mMol / 1000 kcal reduc utilizarea zincului. Când în regimul alimentar sunt introduse cantități suplimentare de calciu și când acesta conține și cantități importante de fitați, este absolut necesar să se țină cont de acțiunea calciului asupra relației fitat/zinc.

Pentru un regim care conține proteine de soia, absorbția zincului poate fi legată de raportul fitat/zinc știind că proteinele animale constituie baza unui conținut ridicat de calciu.

Și alți constituenți ai regimului alimentar influențează valorile raportului fitat/zinc. În concluzie conținutul în proteine a dietei modifică influența valorilor ridicate de fitați asupra absorbției de zinc!

Se presupune că doar formele hexa- și penta-fosforilate ale fitaților inhibă utilizarea zincului. Fitații exogeni care sunt activați în cursul digestiei sau modificați în cursul preparării alimentelor, modifică cu certitudine importanța influenței pe care fitații de origine alimentară o exercită asupra utilizării zincului și fierului. În multe comunități rurale se practică obiceiul de a lăsa la fermentat alimentele vegetale de bază înainte de a fi consumate, timp în care are loc fără îndoială o importantă degradare enzimatică a fitaților și astfel se realizează și o protecție contra dezvoltării unei carențe în zinc.

Mecanismele prin care alimentele bogate în fitați, cum sunt proteinele din soia, pot influența notabil acțiunea fitatului ca inhibitor al zincului prezintă un real interes. Formarea complexilor proteină/fitat/mineral în cursul tratamentului la un pH neutru, favorizează persistența complexilor de zinc stabili pe parcursul digestiei ulterioare. În schimb, izolatele proteice de soia precipitată în mediu acid reține zincul sub o formă disponibilă. Disponibilitatea la șobolani a zincului intrinsec provenind din regim pe baza de izolat proteic de soia este net inferioară celeia a zincului extrinsec.

Complexul calciu/fitat are o mare afinitate pentru plumb și cadmiu. Studiile asupra consecințelor biologice ale acestei interacții demonstrează că dacă calciul din regim depășește 0,6%, fitatul inhibă retenția de plumb în proporție ce poate ajunge la 80% la șobolani. După diverse studii mai aprofundate pe acest subiect, regimurile alimentare bogate în fitat și calciu diminuează retenția plumbului și la om (Friberg et al., 1986; Cotrău și Proca, 1988; Cotrău et al., 1991).

Inhibarea absorbției fierului de către fitat depinde de saturația în metal a complexului fier/fitat prezent în hrană. Fierul din fitatul monofERIC prezent în hrană este utilizat cu predilecție. De asemenea, fitatul solubil inhibă absorbția de fier și așa cum 25 mg de fitat este suficient pentru a reduce cu 70% absorbția fierului, acest efect este total suprimat prin administrarea simultană de 100 mg de acid ascorbic. Fitații alimentari scad absorbția în ficat a cuprului și a manganului la șobolani, dar regula nu este dovedită și în cazul organismului uman.

Numeroase studii indică că un aport ridicat de fier poate interfera absorbția altor oligoelemente esențiale. Efectele adverse ale zincului asupra absorbției fierului induse de un raport fier/zinc de 2/1 sunt agravate prin scăderea ascorbatului, în condițiile în care fitatul alimentar este în cantitate mare. Aceste rezultate arată că aceste antagonisme nu influențează fierul total ci proporția de fier prezentă sub formă oxidată sau redusă. Un

indiciu important în afară de forma sa este descoperirea faptului că fierul din hem în regimul alimentar nu inhibă nici absorbția nici utilizarea sistemică a zincului la om. Interacțiile și antagonismele fierului cu alte elemente pot fi evidențiate mult mai clar când fierul sau alt element (e.g.: cupru sau zinc) sunt administrate în soluție sau în doze mici dispersate într-o alimentație solidă. În acest caz, statutul fierului în subiect se pare ca are o importanță mult mai mică asupra puterii antagoniste a fierului.

La subiecții având o hemoglobină sanguină normală, dar o feritină serică scăzută și o carență moderată în fier, triplează absorbția cadmiului. Observația în ceea ce privește efectul unei carențe moderate în fier asupra absorbției plumbului la om este controversată de alte cercetări. Un studiu în acest sens a relevat faptul că o reducere a stării fierului crește absorbția plumbului –203 liber, de la 20% la 47%. Se poate concluziona deci că absorbția fierului și a plumbului sunt invers proporționale cu concentrația de fitat și de calciu alimentar (Foa și Basilico, 1999).

O cantitate mică de fier în alimentație crește absorbția și retenția de cadmiu, cobalt, mangan și zinc la animalele de laborator. După studii efectuate la șobolani dar și la om, amploarea relației antagoniste între fier și zinc este notabil mai mare dacă se depășește un nivel critic în ingestia celor două metale.

La animalele de laborator se cunoaște efectul de scădere a utilizării fierului în cazul unui nivel ridicat de cupru. Semnificația la om a acestei relații este discutabilă, efectele unui nivel ridicat de zinc fiind mult mai importante.

Variațiile nutriționale moderate în concentrațiile alimentare în cadmiu, fier, mangan și molibden nu afectează într-o manieră semnificativă utilizarea seleniului la șobolani.

Interacțiile ce influențează la nou născuți eliberarea intraluminală și absorbția prin mucoasă a elementelor cum sunt: cuprul, fierul și zincul par să fie responsabile de diferențele semnificative de biodisponibilitate a acestor elemente în laptele matern, laptele de vacă și formulele pe bază de lapte și soia. Lactoferina dintr-un lapte omolog poate acționa ca un liant, facilitând absorbția fierului și zincului. Cuprul din lapte, de obicei legat de albumină, cazeină, citrat – la fel ca și cuprul din laptele praf pe bază de cazeină bovină – sunt mult mai ușor acceptate de nou născuți decât cuprul din formulele cu soia (Costin și Segal, 2001).

Blocajul fizic al oligoelementelor în proteinele din lapte coagulate din stomac, unde ele sunt digerate în moduri diferite în funcție de sursa din care provin, este o altă cauză posibilă a diferențelor de biodisponibilitate a câtorva oligometale în formulele pentru nou născuți.

Aceste diferențe, cum este efectul depresiv al fitaților de soia asupra utilizării în organism a fierului și zincului sunt atribute constante și indezirabile a înlocuitorilor de lapte, pentru care trebuie determinat cu plus de precizie efectul asupra disponibilității cuprului, fierului și zincului la nou născuți.

Diferențele de biodisponibilitate ale seleniului în funcție de alimentele care conțin seleniu nu sunt încă explicabile. Seleniul din carne este probabil utilizat mai ușor de către organism decât cel din pește și mult mai puțin decât cel din ciuperci.

Antagoniștii utilizării iodului pentru sinteza de hormoni tiroidieni au o influență dominantă asupra distribuției mondiale a gușei endemice. În mare se pot distinge două tipuri de activități, dar efectele uneia singure poate fi ameliorată prin creșterea aportului de iod.

Astfel, se impune cunoașterea cât mai în detaliu a tuturor componentelor din alimente, deoarece – așa cum s-a prezentat – un aliment complet, datorită prezenței unor factori antinutritivi (antimineralizanți, antivitaminici), poate deveni un aliment cu calități nutriționale medii.

CONCLUZII

Structurarea datelor expuse în prezenta teză de doctorat cuprinde două secțiuni: prima (formată din două capitole) include date monografice generale și expune metode analitice care se pretează investigațiilor pentru metale; secunda (formată de asemenea, din două capitole) include distinct rezultate ale cercetărilor întreprinse în domeniul micronutrienților minerali (capitolul 3) și date analitice obținute pe un model experimental animal (capitolul 4).

Rezultatele investigațiilor proprii, care au făcut obiectul prezentei teze de doctorat – axate pe aspecte de biochimie alimentară și nutriție – sunt redată în partea întâi. Cercetările întreprinse pe modelul experimental animal – redând date de biochimie analitică – urmărind acțiunea a două oligoelemente (zinc și mangan) asupra diverșilor metaboliți și asupra concentrației de bioelemente și elemente cu potențial toxicogen în țesut renal se prezintă în partea a doua.

1. Datele analitice obținute în urma investigațiilor privind unele biometale și metale cu potențial toxicogen, efectuate prin spectroscopia de absorbție atomică relevă diferențe cantitative în funcție de specia de animale: bovine, suine și de organele luate în studiu: cord, ficat, rinichi, limbă.

1.1. Concentrația bioelementelor metalice investigate (Zn, Cu, Co, Mn) în probele de mușchi de bovine au prezentat diferențe pe regiuni anatomice. Concentrația de Zn este mai mare în regiunea scapulară (m. deltoid – 28,96 μg/g), iar concentrația de Cu, Co și Mn este mai mare în regiunea femurală (m. biceps femural – Cu 0,57 μg/g; Co 0,42 μg/g; Mn 0,11 μg/g). Cuanțumul cel mai mic de Zn, Cu și Co se găsește în regiunea dorsală (m. longissimus dorsi – Zn 17,03 μg/g; Cu 0,39 μg/g; Co 0,28 μg/g), iar concentrația cea mai mică de Mn se găsește în regiunea scapulară (m. deltoid – 0,08 μg/g). În general, cuantumul celor patru minerale analizate scade astfel:

$$\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Co} > \text{Mn}.$$

Studiile au urmărit regiuni anatomice și chiar individualizarea formațiunilor musculare pentru a conferi acuratețe investigațiilor.

1.2. Referitor la cunatumul elementelor cu potențial toxicogen investigate din mușchii de bovine studiați, se menționează faptul că plumbul se găsește în cea mai mare concentrație, urmat de nichel și apoi crom, iar cadmiul a fost decelat doar în urme în probele analizate. În cazul plumbului și nichelului concentrațiile cele mai mari s-au găsit în mușchiul deltoid (Pb 0,98 μg/g; Ni 0,79 μg/g), urmată de concentrația acestor metale în mușchiul biceps femural și apoi în mușchiul longissimus dorsi. Cromul a prezentat cea mai mare concentrație în mușchiul biceps femural (0,13 μg/g), urmată de concentrația în mușchiul longissimus dorsi și mai apoi în mușchiul deltoid.

1.3. În cazul concentrației bioelementelor decelate din organe prelevate de la bovine și de la suine seria de depresie valorică, în general, este:

$$\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Mn} > \text{Co}.$$

Concentrația elementelor cu potențial toxicogen prezintă o scădere, astfel:



Cuantumul de bioelemente minerale și metale cu potențial toxicogen din organe prezintă o depresie concretizată în seriile:

a) În organele prelevate de la bovine s-a constatat diferențe cantitative astfel:

- Zn: ficat > rinichi > cord > limbă;
- Cu: ficat > rinichi > cord > limbă;
- Co: ficat > cord > rinichi > limbă;
- Mn: ficat > rinichi > cord > limbă (decelat doar în urme);
- Pb: rinichi > ficat > cord > limbă;
- Ni: ficat > rinichi > cord > limbă;
- Cr: rinichi > ficat > limbă > cord;
- Cd: s-a decelat doar în probele de rinichi.

b) În cazul organelor prelevate de la suine (determinări efectuate doar pentru rinichi și limbă) s-a constatat variații de quantum după cum urmează:

- Zn: rinichi > limbă;
- Cu: rinichi > limbă;
- Co: rinichi > limbă;
- Mn: rinichi > limbă (decelat doar în urme);
- Pb: rinichi > limbă;
- Ni: rinichi > limbă;
- Cr: rinichi > limbă;
- Cd: s-a decelat doar în urme în probele de organe prelevate de la suine.

Dintre metalele analizate la cele două specii de animale cea mai mare concentrație de Zn, Cu, Co și Mn au prezentat probele de ficat prelevate de la bovine (Zn 22,72 $\mu\text{g/g}$; Cu 14,28 $\mu\text{g/g}$; Co 0,28 $\mu\text{g/g}$ și Mn 1,28 $\mu\text{g/g}$). De asemenea, Pb, Cd și Cr s-au concentrat cel mai mult în rinichi (Pb 1,94 $\mu\text{g/g}$ rinichi bovine; Cd 0,17 $\mu\text{g/g}$ rinichi bovine; Cr 0,10 $\mu\text{g/g}$ rinichi suine), iar Ni a prezentat cel mai mare cunatum în probele de ficat de la bovine (0,50 $\mu\text{g/g}$).

2. În cadrul investigațiilor efectuate asupra modelului experimental animal luat în studiu, s-au efectuat determinări prin care s-a urmărit evaluarea modificărilor homeostazice ale diverșilor metaboliți, consecutive translocării zincului și manganului. Aceste oligoelemente au fost administrate animalelor (șobolani linia Wistar), sub formă de cloruri în doze duble și cvadruple în raport cu necesarul zilnic recomandat – RDI (Recommended Daily Intake). Pentru administrare s-a folosit metoda gavajului. Datele obținute pe grupele experimentale (E_i) s-au raportat la un grup de control (C). Modelul experimental a inclus patru grupe experimentale, astfel: grupul E_1 – la care s-a administrat MnCl_2 în concentrație dublă de Mn față de RDI; grupul E_2 – la care s-a administrat MnCl_2 în concentrație cvadruplă de Mn față de RDI; grupul E_3 – la care s-a administrat ZnCl_2 în concentrație dublă de Zn față de RDI; și grupul E_4 – la care s-a administrat ZnCl_2 în concentrație cvadruplă de Zn față de RDI. La animalele din grupul de control s-a administrat apă potabilă urmând aceeași procedură ca și la grupurile experimentale.

2.1. Cuantumul cationilor din serul sanguin al animalelor a fost influențat și de administrarea de Mn în doze care depășesc RDI astfel: concentrația tuturor cationilor

studiați (Na, K, Ca, Mg și Fe) a crescut la ambele grupe experimentale față de grupul de control. Astfel, Mg și Fe au prezentat modificări semnificative, cuantumul de Mg fiind 3,32 mg/dL la grupul E₁ și 3,76 mg/dL la grupul E₂ comparativ cu 2,53 mg/dL la grupul C, iar cuantumul de Fe 145,8 μg/dL la grupul E₁ și 160,4 μg/dL la grupul E₂ comparativ cu 120,4 μg/dL la grupul C.

Datele experimentale arată că doze mari de Zn influențează concentrația cationilor studiați astfel: crește concentrația Na, K, Mg și Fe din ser sanguin și scade concentrația Ca seric la ambele grupuri experimentale comparativ cu cel de control. Modificări semnificative s-au observat în cazul Mg (3,34 mg/dL grupul E₃; 3,66 mg/dL grupul E₄ comparativ cu 2,53 mg/dL grupul C și Fe (135,4 μg/dL grupul E₄ comparativ cu 120,4 μg/dL grupul de control).

2.2. Administrarea unui exces de Mn determină modificarea unor parametrii protidici la nivel sanguin. Astfel, cuantumul proteinelor totale și albuminelor crește la grupurile experimentale E₁ și E₂, iar concentrația globulinelor scade la grupurile experimentale comparativ cu grupul de control.

În cazul unui exces de Zn concentrația proteinelor totale crește la grupurile experimentale. Dar doze mai mari decât cele recomandate de Zn conduc la scăderea concentrației albuminelor și creșterea concentrației globulinelor serice la ambele grupuri experimentale comparativ cu controlul.

2.3. În ceea ce privește administrarea de Mn în doze care depășesc RDI și aceasta a fost urmată de modificarea concentrației unor enzime studiate. Astfel, concentrația alanil-amino-transferazei, asparagin-amino-transferazei, fosfatazei alcaline și a amilazei a crescut pentru ambele grupuri experimentale față de control.

Concentrația enzimelor serice studiate a fost, de asemenea, perturbată după administrarea unor doze crescute de Zn. Astfel cuantumul alanil-amino-transferazei, fosfatazei alcaline și a amilazei a crescut la ambele grupuri experimentale. Cuantumul asparagin-amino-transferazei a crescut pentru grupul E₃ și a scăzut pentru grupul E₄, comparativ cu grupul C.

2.4. Doze crescute de Mn și Zn determină creșterea acidului uric, creatininei și azotului ureic din serul sanguin la toate cele patru grupuri experimentale comparativ cu cele de control. Modificări semnificative ale acidului uric s-au observat la grupul E₂ 3,50 mg/dL; grupul E₃ 3,53 mg/dL și grupul E₄ 3,61 mg/dL, comparativ cu grupul de control 2,78 mg/dL.

2.5. Excesul de Mn și Zn modifică cuantumul colesterolului și trigliceridelor serice. Astfel, concentrația colesterolului seric crește pentru toate cele patru grupuri experimentale, în timp ce cuantumul trigliceridelor scade la grupurile experimentale comparativ cu grupul C.

2.6. Concentrația glucozei serice crește moderat în cazul administrării unor doze duble de Mn sau Zn comparativ cu grupul de control. Administrarea unor doze cvadruple de Mn sau Zn, perturbă homeostazia biochimică a glicemiei, determinând o creștere semnificativă a glucozei serice față de control.

2.7. Bilirubina totală din serul sanguin după administrarea unor doze în exces de Mn sau Zn crește la toate grupurile experimentale comparativ cu grupul de control. Modificări semnificative se observă la grupul E₁ și E₂ (0,18 mg/dL) comparativ cu grupul de control (0,13 mg/dL).

2.8. În cadrul aspectelor referitoare la translocare s-au efectuat și determinări asupra bioelementelor și elementelor cu potențial toxicogen din țesut renal. Astfel, concentrația unor biominerale din rinichi prelevați de la șobolani Wistar, după administrarea unui exces de mangan sau zinc, suferă modificări concretizate în scăderea sau creșterea concentrației acestora. Cu privire la unele metale cu potențial toxicogen în probele de rinichi prelevate de la șobolani după un exces de mangan sau zinc acestea, în general, își măresc concentrația.

a) La un aport dublu și cvadruplu de Mn față de cel recomandat se observă că pentru determinările din rinichi concentrația de Cu suferă o depresie față de control. Concentrația de Zn și Mn din rinichi crește la un aport de Mn mai mare decât cel recomandat.

Administrarea unor doze de Zn peste doza zilnică recomandată (RDI) modifică concentrația unor biometale cum sunt Cu, Mn și Zn. Concentrația Zn și Cu din rinichi a scăzut după un excedent de zinc în timp ce cuantumul Mn a crescut la grupurile de lucru E₃ și E₄.

Modificări mai semnificative s-au observat în cazul Cu la grupul E₂ (2,69 μg/g) și grupul E₄ (3,08 μg/g) față de control (5,00 μg/g) și în cazul Mn la grupul E₂ (0,87 μg/g) și grupul E₃ (1,22 μg/g) și grupul E₄ (1,41 μg/g) comparativ cu controlul (0,68 μg/g), precum și în cazul Zn la grupul E₄ (15,63 μg/g) față de grupul de control (19,64 μg/g).

b) În cazul metalelor cu potențial toxicogen Cr, Pb și Al decelate în rinichi la șobolani Wistar după un exces de Mn și Zn concentrația acestora crește la grupurile experimentale comparativ cu cel de control. Creșteri foarte semnificative se observă în cazul Pb – grupul E₂ 0,48 μg/g și grupul E₄ 0,44 μg/g comparativ cu grupul de control 0,16 μg/g, precum și în cazul Al – grupul E₂ 7,04 μg/g comparativ cu grupul de control 5,13 μg/g. De la cele prezentate face excepție cazul aportului cvadruplu de Mn care determină scăderea cunatumului de crom, aceasta devenind nedecelabilă în soluția de analizat (fiind în concentrație foarte mică).

BIBLIOGRAFIE

1. Abou-Seif M.A.M., El-Naggar M.M., El-Far M., Ramadan M., Salah N. – Prevention of Biochemical Changes in gamma-Irradiated Rats by Some Metal Complexes, *Journals of Natural Sciences – Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2003, 41(7), 926-933.
2. Afzal Rizvi M., Shameel M. – Distribution of elements in marine algae of Karachi Coast, *Pak. J. Bot.*, 2001, 33(4), 357-363.
3. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Eatson J.D. – *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edition, Gerald Publ., Inc., New York-London, 1983.
4. Allen J.G., Master H.G., Peet R.L., Mullins K.R., Lewis R.D., Skirre S.Z., Fry J. – Zinc toxicity in ruminants, *J. Comp. Path.*, 1983, 93, 363-377.
5. Allen J.g., Morcombe P.W., Master H.G., Petterson D.S., Robertson T.A. – Acute zinc toxicity in sheep, *Austr. Vet. J.*, 1986, 63, 93-95.
6. Altman P.L., Dittmer S. Dorothy (Eds.) – *Metabolism*, Publ. by Federation of Amer. Soc. for Exp. Biol., Bethesda, 1968.
7. Altura B., Burton M. – Magnesium: Growing in Clinical Importance, *Patient Care*, 1994, 28(1), 130-136.
8. Anderegg G., Flaschka H., Sallmann R., Schwartzenbach G. – Metallindikatoren VII ein auf Erdalkaluonen ansprechendes Phtalein und serine analytische Veswendung HELV, *Chim Acta*, 1954, 37, 133-120.
9. Anke M., Grün M., Groppe B., Kronemann H. – The biological importance of lithium, pp. 217-239, in “Mengen- und Spurenelemente, 1. Arbeitstagung 1981”, Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1981.
10. Anke M., Szentmihalyi S., Regius A., Grun M. – Essentiality of nickel for flora and fauna, pp. 15-60, in: *Proc. Internat. Symp. on New Results in the Research of hardly known Trace Elements*, University of Horticulture and Food Industry, Budapest, 1982.
11. Anke M., Groppe B., Kosla T. – Die biologische Bedeutung des Vanadiums fur den Wiederkrauer, pp. 451-467, in “Mengen- und Spurenelemente, 4. Arbeitstagung 1984”, Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1984.
12. Anke M., Groppe B. – Toxic actions of essential trace elements (Mo, Cu, Zn, Fe, Mn), pp. 201-236, in *Trace Element – Analytical Chemistry in Medicine and Biology*, Vol. 4, Walter de Gruyter & Co., Berlin-New York, 1987.
13. Anke M., Groppe B., Muller M., Regius A. – Effects of aluminium-poor nutrition in animals, pp. 303-324, in: *Proc. 4th International Symposium on New Results in the Food Industry*, Budapest, 1990.
14. Anke M., Meissner D., Mills C.F. – *Trace elements in Man and Animals*, Verlag Media Touristik, Gersdorf, 1993a.
15. Anke M., Lösch E., Angelow L., Krämer K. – Die Nickelgaben der Nahrungskette von Pflanze, Tier und Mensch in Deutschland. 3. Der Nickelgehalt der Lebensmittel und Getränke des Menschen, pp. 400-414, in “Mengen- und Spurenelemente, 13. Arbeitstagung 1993”, Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1993b.
16. Anke M., Angelow L., Gleis M., Müller M., Illing H. – The biological importance of nickel in the food chain, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1995, 352, 92-96.

17. Anke M., Groppe B., Angelow L., Dorn W., Drusch S. – Bromine and essential element for goats, pp. 737-738, in: Proc. Trace elements in Man and Animals (TEMA 8), Verlag Media Touristik, Gersdorf, Germany, 1996.
18. Anke M., Müller M., Arnhold W., Gleis M., Illing Günther Heike, Drobner Cordula, Seifert M., Röhring B. – Problems of the trace and ultratrace element supply of humans in Europe, pp. 15-34, in "Proceedings of the 2nd International Symposium on Metal Elements in Environment, Medicine and Biology (Gârban Z., Drăgan P. Eds.), Timișoara, 27-29 October 1996, Publishing House "Eurobit" Timișoara, 1997.
19. Anke M., Dorn W., Illing-Günther H., Holzinger S., Jaritz M., Gleis M., Müller M., Schäfer U., Lösch E. – Die biologische Bedeutung des Vanadiums in der Nahrungskette. 5. Mitteilung: Vanadiumverzehr, Vanadiumausscheidung und Vanadiumbilanz Erwachsener in Abhängigkeit von Geschlecht, Zeit, Alter, Gewicht, Jahreszeit, Lebensraum und Leistung, pp. 1028-1040, in "Mengen- und Spurenelemente, 18. Arbeitstagung 1998", Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1998.
20. Arnhold W., Anke M., Müller M., Gleis M. – Vanadium an essential element for goats, pp. 739-740, in: Proc. Trace elements in Man and Animals (TEMA 8), Verlag Media Touristik, Gersdorf, Germany, 1993.
21. Aron D.I. – Trace elements in plant physiology, pp. 31-38, in Biological Miscellany, Vol. 3, Chronica Botanica Co., Waltham, MA, 1950.
22. Attri J., Dhawan V., Mahmood S., Pandhi P., Parwana H.K., Nath R. – Effect of Vitamin C Supplementation on Oxidative DNA Damage in an Experimental Model of Lead-Induced Hypertension, Ann. Nutr. Metab., 2003, 47, 294-301.
23. Badawy N.B.A., El Salam M.A., Eissa S.M. – Studies on some enzymatic activities among zinc workers, pp. 77-79, in: Heavy Metals in the Environment, 6th International Conference, New Orleans, September 1987. Vol. 2, (Lindberg S.E., Hutchinson T.C. Eds. CEP Consultants, Edinburgh), New Orleans, 1987.
24. Baly, D. L., Lonnerdal B., Keen C. L. – Effects of high doses of manganese on carbohydrate homeostasis, Toxicology Letters, 1985, 25, 95-102.
25. Baly D.L., Schneiderman J.S., Garcia-Welsh A.L. – Effect of manganese deficiency on insulin binding, glucose transport and metabolism in rat adipocytes, J Nutr., 1990, 120, 1075-1079.
26. Banta R.G., Markesbery W.R. – Elevated Manganese Levels Associated With Dementia and extrapyramidal signs. Neurology, 27, 1977, 217-222.
27. Baraka T.A., El-Sherif M.T., Kubesy A.A., Illek J. – Observations on zinc and copper levels in the serum in dromedary camels, pp. 452-459, in "Mengen- und Spurenelemente, 19. Arbeitstagung 1999", Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1999.
28. Bergmeyer H.U., Scheibe P., Wahlefeld A.W. – Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase, Clin. Chem., 1978, 24(1), 58-73.
29. Bernard C. – Introducere în studiul medicinei experimentale (traducere din lb. Franceză), Ed. Științifică, București, 1958.
30. Bertholf, R.L. – Zinc, pp. 787-800, in "Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds" (Sigel H., Seiler H.G. Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1988.

31. Boffetta P., Merler E., Vainio H. – Carcinogenicity of mercury and mercury compounds, *Scan. J. Work Environment Health*, 1993, 19(1), 1-7.
32. Bowen H.J.M. – *Trace Elements in Biochemistry*, Academic Press, London and New York, 1966.
33. Bowers G.N., McComb R.B. – A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase, *Clin. Chem.*, 1966, 12, 70.
34. Brandao-Neto J., DeMendonca B.B., Shuhama T., Marchini J.S., Pimenta W.P., Tornero M.T. – Zinc acutely and temporarily inhibits adrenal cortisol secretion in humans., *Biol. Trace Element Res.*, 1990, 24, 83-89.
35. Brashier M.K., Geor R.J., Ames T.R., O'Leary T.P. – Effect of intravenous calcium administration on gentamicin-induced nephrotoxicosis in ponies, *Am. J. Vet. Res. (United States)*, Aug. 1998, 59(8), 1055-1062.
36. Bremner I. – Interactions between metallothionein and trace elements, *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1987a, 11(1), 1-37.
37. Bremner I. – Nutritional and physiological significance of metallothionein, *EXS*, 1987b, 52, 81-107.
38. Brezeanu Maria, Cristureanu Elena, Antoniu Ariana, Marinescu Dana, Andruh M. – *Chimia metalelor*, Ed. Academiei Române, București, 1990.
39. Brock A.A., Chapman S.A., Ulman E.A., Wu G. – Dietary manganese deficiency decreases rat hepatic arginase activity, *J. Nutr.*, 1994, 124, 340-344.
40. Broun E.R., Greist A., Tricot G., Hoffman R. – Excessive zinc ingestion. A reversible case of sideroblastic anemia and bone marrow depression, *J. Am. Med. Assoc.*, 1990, 264, 1441-1443.
41. Bulger H.A., Johns H.E. – The determination of plasma uric acid, *J. Biol. Chem.*, 1941, 140, 427.
42. Chan H.M., Berti P.R., Receveur O., Kuhnlein H.V. – Evaluation of the population distribution of dietary contaminant exposure in an Arctic population using Monte Carlo statistics, *Environ. Health Perspect. (United States)*, 1997, 105(3), 316-321.
43. Chiharu T., Zahir S., Kenneth E., Stanton H. – Metallothionein excretion in urine upon cadmium exposure: its relationship with liver and kidney cadmium, *Toxicology*, 1981, 22(3), 181-191 (C.A. 96: 80968s).
44. Chobanian S.J. – Accidental ingestion of liquid zinc chloride: local and systemic effects, *Ann. Emerg. Med.*, 1981, 10, 91-93.
45. Chua A.C.G., Morgan E.H. – Effects of Iron Deficiency and Iron Overload on Manganese Uptake in the Brain and Other organs of Rat. *Biological Trace Element Research*, 1996, 55, 39-54;
46. Ciudin Elena, Marinescu D. – *Animale de laborator*, Vol. 1, Ed. All, București, 1996.
47. Ciudin Elena, Marinescu M. – *Patologia animalelor de laborator și tehnica experimentală*, Ed. Moldogrup, Iași, 1997.
48. Cocco P., Fu Hua, Boffetta P., Carta P., Flore C., Flore Valeria, Onnis A., Picchiri F.F., Colin D. – Mortality of Italian lead smelter workers, *Scan J. Work Environ. Health*, 1997, 23(1), 15-23.
49. Collipp P.J. Collipp PJ, Chen SY, Maitinsky S. – Manganese in Infant Formulas and Learning Disability. *Ann. Nutr. Metab.*, 27, 1983, 488-494.

50. Comoroșan A. – Manualul Laboratorului Clinic, Ed. Medicală, București, 1964.
51. Connerty H.V., Briggs A.R. – Determination of serum calcium by means of o-cresolphthalein complexone, *Am J Clin Path*, 1966, 45, 290-296.
52. Cordoș E., Manoliu C. – Spectrometria de absorbție și fluorescență atomică, Ed. Tehnică, București, 1983.
53. Cordoș E., Frențiu T., Ponta Michaela, Rusu Ana-Maria, Fodor A. – Analiza prin spectrometrie atomică, Institutul Național de optoelectronică, București, 1998.
54. Costin G.M., Segal Rodica (Eds.) – Alimente pentru Nutriție specială – Alimentele și sănătatea, Ed. Academică, Galați, 2001.
55. Cotrău M., Popa L., Stan T., Preda N., Ajtay M. – Toxicologie, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1991.
56. Cotrău M., Proca M. – Toxicologie analitică, Ed. Medicală, București, 1988.
57. Couzy F., Keen C., Gershwin M.E., Mareschi J.P. – Nutritional implications of the interactions between minerals, *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1993, 17(1), 65-87.
58. Crumbrowski J., Klemm P. – Die Cadmiumakkumulationshöhe in menschlichen Organen – Faktoren ihrer Beeinflussung, pp.261-269, in “Mengen- und Spurenelemente, 1. Arbeitstagung 1981”, Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1981.
59. Daranyi Gabriela, Gârban Z., Dumitru M., Vincu Mirela, Aumuller Corina, Jula Simona – Aspecte de toxicologie alimentară privind unele metale cu potențial toxicogen, din carne și produse de carne, pp. 147-152, în “Proceedings of the Scientific Communications Meeting of Aurel Vlaicu University” Arad, 3rd edition, Vol. II, Arad, May 16-17, 1996.
60. Daranyi Gabriela, Vincu Mirela, Petroman I., Aumuller Corina, Deacu Ana, Lalescu M., Gârban Z. – Aspects of food toxicology in humans concerning metals in meat and organs. Note I: Metals in swine and organs, pp. 145-150, in “Metal Elements in Environment, Medicine and Biology”, Proceedings of the 2nd International Symposium, Timișoara – Roumania, October 27-29, 1996 (Eds. Gârban Z., Drăgan P.), Publishing House “Eurobit” Timișoara, 1997;
61. Daranyi Gabriela, Vincu Mirela, Gârban Z. – Peculiarities of the Relationship Nutrition = metaphylaxis of urolithiasis. II. Nutritional aspects regarding the role of metals in purine urolithiasis, p. 108-118, in Proceedings of “8th International Trace Element Symposium”, Budapest, Hungary, September 3-5, 1998.
62. Daranyi Gabriela, Vincu Mirela, Gârban Z., Avacovici Adina, Clep Camelia, Velciov P., Rinovetz A., Șelariu C. – The bioavailability of biomineral compounds: Nutritional and pharmacological significance, in *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine – Bioavailability and Health effects*, 2000, 6(2-3), 156-160.
63. Davidsson L., Caderblad A., Lonnerdal B., Sandstrom B. – The Effects of Individual Dietary Components on Manganese absorption in humans., *American Journal of Clinical Nutrition*, 1991, 54, 1065-1070.
64. Davis C., Reeves R. – A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation – High value opportunities from the chicken egg, RIRDC Publication No. 02/094, RIRDC Project No. DAQ – 275A, Canprint, 2002.

65. Dehghani G.A., Ahmadi S., Omrani G.R. – Effects of vanadyl sulphate on glucose homeostasis in severe diabetes induced by streptozotocin in rats, *Indian Journal of Medical Research*, 1997, 106, 481-485.
66. Deknuddt, G.H. – Clastogenic effects of zinc in mammals, *C.R. Soc. Biol.*, 1982, 176, 563-567.
67. Delves H.T. – The relevance of aluminium in food. *Iron + Al in Biology – Spring Meetin Norwich, U.K.*, 1990;
68. Denison H., Jern S., Jagenburg R., Wendestam C., Wallerstedt S. – Influence of increased adrenergic and magnesium depletion on cardiac rhythm in alcohol withdrawal, *Br. Heart J.*, England, 1994, 72(6), 554-560.
69. Derek H.S. – *Essential Nutrients in Supplements: Commissioned by European Federation of Associations of Health Product Manufactures*, Cambridge, UK, 1995.
70. Diaconu Rodica, Voroniuc Otilia, Navrotescu Tinca, Iorga I., Rusu Lidia – Aluminium in drinking water – a possible risc factor for population health, pp. 157-160, in *Proceedings of 2nd International Symposium on “Metal Elements in Environment, Medicine and Biology”*, October 27-29, 1996, Timișoara, Roumania (Gârban Z., Drăgan P. Eds.), Publishing House “Eurobit”, Timișoara, 1997.
71. Dichtt J.J. – *Reference Intervals for Serum Amylase and Urine Creatinine on the aca(R) discrete clinical analyzer*, DuPont Company, Wilmington, DE. 1984.
72. Diez-Ewald M. Weintraub L.R., Crosby W.H. – Interrelationship of Iron and Manganese Metabolism, *Proceedings of the Society of Experimental and Biological Medicine*, 1968, 129, 448-451.
73. Dinu Veronica, Truția E., Popa-Cristea Elena, Popescu Aurora – *Biochimie medicală – Mic tratat*, Ed. Medicală, București, 1996.
74. Dogaru C., Dragoș D. – *Biochimie – Metode de laborator*, Ed. Mirton, Timișoara, 1998.
75. Dogaru C., Rusu V., Belengeanu V., Moldovan I. – *Biochimie clinică*, Ed. Mirton, Timișoara, 2002.
76. Drabek O., Boruvka L., Mladkova L., Cechmankova J. – Testing extraction methods for the determination of potentially toxic forms of aluminium in soil samples, pp. 194-199, in “*Mengen- und Spurenelemente. 21 Arbeitstagung 2002*”, Friedrich-Schiller-Universität Jena, (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Leipzig Schubert, Leipzig, 2002.
77. Drăgan P., Daranyi Gabriela, Bucuraș V., Avacovici Adina, Vincu Mirela, Gârban Z. – Profile of metallograms in phosphatic uroconcrements, pp. 888-895, in “*in “Mengen- und Spurenelemente, 19. Arbeitstagung 1999”*”, Friedrich Schiller Universitat Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1999.
78. Drebigkas V., Zabulyte D. – Effect of vanadium, titanium and chromium on the animal organism, pp. 697-698, in “*Mengen- und Spurenelemente. 17 Arbeitstagung 1997*”, Friedrich-Schiller-Universität Jena, (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Leipzig Schubert, Leipzig, 1997.
79. Dreosti I.E. – Magnesium status and health, *Nutrition Reviews*, 1995, 53(9), S23-S27.
80. Drinker K.R., Thompson P.K., Marsh M. – An investigation of the effect upon rats of long continued ingestion of zinc compounds, with a special reference to the relation of zinc excretion to zinc intake., *Am. J. Physiol.*, 1927, 80, 284-306.

81. Duguay A.B., Yousef I.M., Plaa G.L. – Manganese-bilirubin effect on cholesterol accumulation in rat bile canalicular membranes, *Toxicological Sciences*, 2000, 53(1), 150-155.
82. Duhr E.F., Pendergrass J.C., Slevin J.T., Haley B.E. – HgEDTA complex inhibits GTP interaction with the E-site of brain beta-tubulin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1993, 122(2), 273-280.
83. Edmonds M.S., Arentson B.E. – Effect of supplemental vitamins and trace minerals on performance and carcass quality in finishing pigs, *J. Anim. Sci.*, 2001, 79, 141-147.
84. Elinder C.G. – Zinc, in „Handbook on the Toxicology of Metals, 2nd ed.. Vol. II: Specific Metals (Eds.: Friberg L., Nordberg G.F., Vouk V.B.), Elsevier, New York, 1986.
85. Enriques E., Silvo R. – New method for the determination of the bilirubin content of serum and duodenal juices, *Biochem. Z.*, 1926, 169, 152-160.
86. Eriksson H., Lenngren S., Heilbronn E. – Effect of long-term administration of manganese on biogenic amine levels in discrete striatal regions of rat brain. *Archives of toxicology*, 1987, 59, 426 – 431.
87. Eum W.S., Kang J.H. – Release of copper ions from the familial amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu, Zn-superoxide dismutase mutants, *Mol. Cells (Korea – South)*, 1999, 9(1), 110-114.
88. Fields M., Lewis C.G. – Hepatic iron overload may contribute to hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia in copper – deficient rats, *Metabolism*, 1997, 46(4), 377-381.
89. Finley J.W. – Manganese absorption and retention by young women is associated with serum ferritin concentration. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, 70, 37-43.
90. Finley J.W., Johnson P.E., Johnson L.K. – Sex Affects Manganese Absorption and Retention by Humans in a Diet Adequate in Manganese. *American Journal of Clinical Nutrition.*, 1994, 60, 949-955.
91. Foa V., Basilico S. – Chemical and physical characteristics and toxicology of man-made mineral fibers, *Med. Lav. (Italy)*, 1999, 90(1), 10-52.
92. Foo S.C., Ngim C.H., Salleh I., Jeyaratnam J., Boey K.W. – Neurobehavioral effects in occupational chemical exposure, *Environ. Res.* 1993, 60 (2), 267-273.
93. Fox M.R.S., Jacobs R.M. – Zinc: essentiality, function, effects of deficiency, and requirements, pp. 214-248, in “Metal Ions in Biological Systems”, (Sigel H. Ed.), Marcel Dekker Inc., New York, 1986.
94. Frank A., Galgan V. – Vanadium concentrations in bovine liver, toxicological aspects – normal values, pp. 552-560, in “Mengen- und Spurenelemente, 15. Arbeitstagung 1995”, Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1995.
95. Francis A.A., Forsyth C. – Chemical Hazard Evaluation Group, Biomedical and Environmental Information Analysis Section, Health Sciences Research Division, Oak Ridge National Laboratory (Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program), Lockheed Martin Energy Systems, Inc., Oak Ridge, Tennessee, 1995.
96. Frech W., Cedergren A., Cederberg C., Vessman J. – Evaluation of some critical factors affecting determination of aluminium in blood, plasma, or serum by electrothermal atomic absorption spectroscopy, *Clin. Chem.*, 1982, 28(11), 2259-2263 (C.A. 97: 211929a)

97. Frech W., Lindberg A.O., Lundberg E., Cedergren A. – Atomization mechanisms and gas phase reactions in graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 1986, 323(7), 716-725 (C.A. 105: 107406a).
98. Freeland-Grves J.H., Lin P.H. – Plasma uptake of manganese as affected by oral loads of manganese, calcium, milk, phosphorus, copper, and zinc, *J. Am. Coll. Nutr.*, 1991, 10, 38-43;
99. Friberg L., Nordberg G.F, Vouk V.B. (Eds.) – *Handbook on the Toxicology of Metals*, 2nd ed., Vol. II: Specific Metals, Elsevier, New York, 1986.
100. Gârban Z., Paraschivoiu R., Borza Rodica, Rancov F., Jurebie Livia, Vincu Mirela, Boc Dana, Domnițeanu Camelia – Food additives with metal content in the countries of the European Economical Community, pp. 107-110, in “Metal Elements in Environment, Medicine and Biology”, October 21-23, 1993, (Eds. Drăgan P., Gârban Z.), Publishing House “Mirton”, Timișoara, 1995.
101. Gârban Z., Daranyi Gabriela, Gogoasă I., Vincu Mirela, Lupșa Ioana, Matei Suzana – Investigation concerning the concentration of some metal elements in meat food products. Note I. Preliminary data., pp. 159-162, *Lucrări științifice. Semicentenar Universitatea “S.A.B.” Timișoara*, Ed. Eurobit, Timișoara, 1995a.
102. Gârban Z., Dumitru M., Lăcătușu R., Gâțlan Doina, Vincu Mirela, Avacovici Adina – Investigation concerning the concentration of some metal elements in meat food products. Note II. Analytical aspects, importance for human nutrition., p. 175, *Lucrări științifice. Semicentenar Universitatea “S.A.B.” Timișoara*, Ed. Eurobit, Timișoara, 1995b.
103. Gârban Z. – *Biologie moleculară – Probleme fundamentale și aplicative*, ed. 3, Ed. Eurobit, Timișoara, 1997.
104. Gârban Z. – Interaction of deoxyribonucleic acid with divalent metal ions and structural peculiarities of the resulted complexes, p. 99-108, in “Proceedings of the 2nd International Symposium on Metal Elements in Environment, Medicine and Biology (Gârban Z., Drăgan P. Eds.)”, Timișoara, 27-29 October 1996, Publishing House “Eurobit” Timișoara, 1997.
105. Gârban Z., Sarafolean S., Gergen I., Vincu Mirela, Avacovici Adina, Mircov V. – Efecte biochimice induse de aluminiu în țesuturi și organe la animalele de laborator și la om, pp. 213 – 222, în *Anuarul “Cercetări Științifice – Științe, procese și tehnologii agroalimentare”*, Vol. IV, Universitatea “S.A.M.V.B.” Timișoara, Ed. Agroprint, Timișoara, 1998.
106. Gârban Z. – *Biochimie: Tratat comprehensiv*, Vol. I, Partea 1, ediția 2-a, Ed. Didactică și Pedagogică R.A., București, 1999.
107. Gârban Z., Vincu Mirela, Avacovici Adina – Importance of nutritional studies concerning the concentration of some mettalic bioelements in meat and meat products, p. 21-28, in “Food Industry Technologies and Nourishment – Proceedings and lessons of The International Summer School (Eds. Mrenie D. and Țucu D.)”, August 16-29, Timișoara, 1999.
108. Gârban Z. – *Nutriția umană*, Vol. I, ed. a 2-a, Ed. Didactică și Pedagogică R.A., București, 2000.
109. Gârban Z. – *Biologie Moleculară – probleme fundamentale și aplicative*, Ediția a 4-a, Ed. Eurobit, Timișoara, 2001.
110. Ghergariu S. – Aluminium: an inert, essential or toxic trace element?, pp. 73-82, in *Proceedings of 2nd International Symposium on “Metal Elements in Environment, Medicine*

- and Biology”, October 27-29, 1996, Timișoara, Roumania (Eds. Gârban Z., Drăgan P.), Publishing House “Eurobit”, Timișoara, 1997.
111. Ghergariu S. – Oligominerale și oligomineraloze, Ed. Academiei R.S. România, București, 1980.
 112. Ghizdavu L. – Chimie Bioanorganică. Editura Poliam, Cluj-Napoca, 2000.
 113. Goering P.L. – The Road to Elucidating the Mechanism of Manganese-Bilirubin-Induced Cholestasis, *Toxicological Sciences*, 2003, 73(2), 216-219.
 114. Gonțea I. – Alimentația rațională a omului, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1971.
 115. Goodwin T.W., Mercer E.I. – Introduction to Plant Biochemistry, Pergamon Press Ltd., Oxford-New York-Toronto-Sydney-Paris-Frankfurt, 1983.
 116. Gordon Elizabeth F., Bond Jenny T., Gordon R.C. – Zinc deficiency and behavior; a developmental perspective, *Physiol. Behav.*, 1982, 29(5), 893-897 (C.A. 96: 216471j).
 117. Gottschalk L.A., Rebello T, Buchsbaum MS, Tucker HG, Hodges EL. – Abnormalities in Hair Trace Elements as Indicators of Aberrant Behavior., *Comprehensive Psychiatry*, 1991, 32, 229-237.
 118. Grecu I., Neamțu Maria, Enescu I. – Implicațiile biologice și medicale ale chimiei anorganice, Ed. Junimea, Iași, 1982.
 119. Greger J.L., Baligar P., Abernathy R.P., Bennett O.A., Peterson T. – Calcium, magnesium, phosphorus, copper and manganese balance in adolescent girls. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1978, 31, 117-121.
 120. Grosicki A., Domanska K. – Comparison of cadmium retention following various dosages, pp. 727-730, in “Mengen- und Spurenelemente, 19. Arbeitstagung 1999”, Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1999.
 121. Grün M., Anke M., Hennig A., Kronemann H. – Die biologische Bedeutung des Schwermetalls Blei, pp. 159-178, in “Mengen- und Spurenelemente, 2. Arbeitstagung 1982”, Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1982.
 122. Guizonarn Helene, Motais Rene – Swelling activation of transport pathways in erythrocytes: effects of Cl⁻, ionic strength, and volume changes, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 1999, 276, C210-C220.
 123. Gurjar B.R., Mohan M., Sidhu K.S. – Potential health risks related to carcinogens in the atmospheric environment in India, *Regul. Toxicol. Pharmacol. (United States)*, 1996, 24(2), 141-148.
 124. Guthrie Helen Andrews – Introductory Nutrition, 3rd Edition, C.V. Mosby Company, Saint Louis, U.S.A., 1975;
 125. Hagen J.H., Hagen P.B. – An enzymatic method for the estimation of glycerol in blood and its use to determine the effect of noradrenaline on the concentration of glycerol in blood, *Can. J. of Biochem. And Physiol.*, 1962, 40, 1129.
 126. Haiduc I. – Metals in medicine: past, present, future, pp. 35-42, in *Proceedings of 2nd International Symposium on “Metal Elements in Environment, Medicine and Biology”*, October 27-29, 1996, Timișoara, Roumania (Gârban Z., Drăgan P. Eds.), Publishing House “Eurobit”, Timișoara, 1997.

127. Hamilton E.I., Minsky M. J., Cleary J.J. – The concentration and distribution of some stable elements in healthy human tissues from the United Kingdom, *Sci. Total. Environ.*, 1972, 1, 341-374.
128. Hecht H. – Differences in the heavy metal content of domestic pigs and wild pigs and the reasons for them, *Fleischwirtschaft*, 1987, 67(12), 1511-1514; 1517-1518 (C.A. 108: 130188b).
129. Helrich K. (Ed.) – Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th edition, Publ. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, 1990.
130. Hemken R., Clark T.W., Du Z., Pietschi M. – Effects of source and level of copper and zinc addition on growth and organ trace mineral levels in rats. pp. 689-692, in “Mengen- und Spurenelemente, 19. Arbeitstagung 1999”, Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1999.
131. Higgins T. – Novel chromogen for serum iron determination, *Clin. Chem.*, 1981, 27, 1619-1620.
132. Hill G.M., Ku P.K., Miller E.R., Ullrey D.E., Stowe H.D., Losty T.A. O’Dell B.L. – Zinc-induced copper deficiency in swine, pp. 564-567, in *Proc. Int. Symp. 4th 1981 – Trace Elem. Metab. Man Anim.*, (Eds. Gawthorne J.M., Howell L.McC., White C.L.), Springer: Berlin, 1982 (C.A. 96: 198290t).
133. Hoffman H.N., Phyliky R.L., Fleming C.R. – Zinc-induced copper deficiency, *Gastroenterology*, 1988, 94, 508-512.
134. Holzinger Sylvia, Anke M., Rohrig B., Gonzales Delia – Molybdenum intake of adults in Germany and Mexico, *Analyst*, 1998, 123(3), 447-450.
135. Hooper P.L., Visconti L., Garry P.J., Johnson G.E. – Zinc lowers high density lipoprotein-cholesterol levels, *J. Am. Med. Assoc.*, 1980, 244, 1960-1961.
136. Isermann K. – Cadmium – Ökobilanz der Landwirtschaft, pp. 200-208, in “Mengen- und Spurenelemente, 12. Arbeitstagung 1992”, Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1992.
137. Ishitani K., Itakura E., Goto S, Esashi T. – Calcium absorption from the ingestion of Coral derived calcium by humans, *J. Nutr. Sci. Vit.*, 1999, 45(5), 509-517.
138. Ivanoviene L., Sadauskiene I., Lesauskaite V., Stapulionis R., Ivanov L. – Cadmium-induced apoptosis in mouse liver, pp. 687-692, in “Mengen- und Spurenelemente. 21 Arbeitstagung”, Friedrich-Schiller-Universität Jena, (Hrsg. Anke M. et al.), Schubert Verlag Leipzig, 2002.
139. Jefferson J.W. – Potassium Supplementation in Lithium Patients: a Timely Intervention or Premature Speculation?, *Journal of Clinical Psychiatry*, 1992, 53(10), 370-372.
140. Jendrassik L., Grof P. – Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubin, *Biochem Z.*, 1938, 297-281.
141. Johnson H.L., Sauberlich H.E. – Trace element analysis in biological samples, pp 405-426, in “Clinical, Biochemical and Nutritional Aspects of Trace Elements”, (Prasad A.S. Ed.), Alan Liss Inc, New York, US, 1982.
142. Julean I., Rotărescu Alina – *Chimie analitică informatizată*, Ed. Mirton Timișoara, 1997.
143. Kalckan H.M. – Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes, *J. Biol. Chem.*, 1947, 167, 429.

144. Kaplan L., Pesce A. – Clinical chemistry, The C.V. Mosby Comp., St. Louis-Toronto-Princeton, 1984.
145. Kaplan J.C., Delpuch M. – Biologie moléculaire et médecine, Flammarion, Paris, 1990.
146. Kawasaki T., Itoh K., Kawasaki M. – Reduction in blood pressure with a sodium-reduced potassium- and magnesium-enriched mineral salt in subjects with mild essential hypertension, *Hypertension Research*, 1998, 21(4), 235-243.
147. Kékedy L. – Chimie analitică calitativă, Scrisul Românesc, Craiova, 1982.
148. Kerr L.A., Edwards W.C. – Chromate poisoning in livestock from oil field wastes, *Vet. Hum. Toxicol.*, 1981, 23(6), 401-402 (C.A. 96: 29613v).
149. Kliment V. – Model of multiple exposure to contaminants in monitoring the environmental impact on population health, *Cent. Eur. J. Public Health (Czech Republic)*, 1996, 4(4), 246-249.
150. Klos A., Rozmysl E., Bertrandt J. – Nickel content in daily food rations used in alimentation of young men doing military service in Polish Army, pp. 375-380, in “Mengen- und Spurenelemente. 20. Arbeitstagung 2000”, Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 2000.
151. Komura J., Sakamoto M. – Effects of Manganese Forms on Biogenic amines in the Brain and Behavioural Alterations in the Mouse: Long Term Administration of Several Manganese Compounds, *Environmental Research*, 1992, 57, 34-44.
152. Koper J., Piotrowska A. – Changes of soil urease activity and Ni content as caused by different soil fertilization, pp. 171-176, in “Mengen- und Spurenelemente. 21 Arbeitstagung 2002”, Friedrich Schiller Universität Jena, (Hrsg. Anke M. et al.), Schubert Verlag Leipzig, 2002.
153. Kosla T., Roga-Franc M., Rokicki E., Gralak M. – Lithium concentrations in environment and its circulation in soil-plant-blood serum chain, pp. 340-347, in “Mengen- und Spurenelemente, 15. Arbeitstagung 1995”, Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1995.
154. Krejpcio Z., Smigiel-Papinska D., Wojciak R.W., Olejnik D. – The influence of dietary magnesium on tissue distribution of zinc in male Wistar rats, pp. 836-840, in “Mengen- und Spurenelemente, 20. Arbeitstagung 2000”, Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 2000.
155. Kulinski B., Buchner M., Schweder R., Nagel R. – Acute pancreatitis – a free radical disease. Decrease in fatality with sodium selenite (Na₂SeO₃) therapy, *Z. Gesamte Inn. Med.*, 1991, 46, 145-149.
156. Kunst A., Draeger B., Ziegenhorn J. – UV-methods with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. IV, Bergmeyer, HU, Ed. Verlag Chemie, Deerfield, Fl 1983, pp. 163-172.
157. Lai J.C., Leung T.K., Lim L. – Differences in the neurotoxic effects of manganese during development and aging: some observations on brain regional neurotransmitter and non-encephalopathy, *Neurotoxicology*, 1984, 5, 37 – 47.
158. Lai J.C., Leung T.K., Lim L., Chan A.W., Minski M.J. – Effects of chronic manganese treatment on rat brain regional sodium-potassium-activated and magnesium-activated adenosine triphosphatase activities during development, *Metab. Brain Dis.*, 1991, 6, 165-174.

159. Lajunen L.H.G. – Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission, Royal Society of Chemistry, 1992.
160. Larsen K. – Creatinine assay by a reaction-kinetic approach, *Clin. Chem. Acta*, 1972, 41, 209-217.
161. Lawrence T.E., Dikeman M.E., Stephens J.W., Obuz E. Davis J.R. – In situ investigation of the calcium-induced proteolytic and salting-in mechanisms causing tenderization in calcium-enhanced muscle, *Meat Science*, June 2002, 61(2), 169-179.
162. Leung T.K.C., Lim L., Lia J.C.K. – Brain regional distributions of monoamine oxidase activities in postnatal development in normal and chronically manganese-treated rats, *Metab. Brain Dis.*, 1993, 8, 137-149.
163. Lipko M., Orzechowski A., Kuryl T., Debski B. – Influence of chromium ions on glucose uptake in mouse myotubes, pp. 560-566, in “Mengen- und Spurenelemente, 21. Arbeitstagung 2002”, Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 2002.
164. Liteanu C. – Chimie analitică cantitativă, Volumetria, ed. a 6-a, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1973.
165. Lovatt C.J. Dugger W.M. – Boron, pp. 389-421, in “Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements”, (Frieden Ed.) Plenum Press, New York – London, 1984.
166. Mack R.B. – A hard day’s knight, zinc phosphide poisoning, *N.C. Med. J.*, 1989, 50, 17-18.
167. Madsen A., Hansen V. – Danish experiments with copper for bacon pigs. *Comm. Eur. Communities*, 1981 (C.A. 96: 141513p).
168. Maita K., Hirano M., Mitsumori K. – Subacute toxicity with zinc sulfate in mice and rats, *J. Pesticide Sci.*, 1981, 6, 327-336.
169. Maitani T., Suzuki K.T. – Changes of essential metal levels in selected tissues and splenomegaly induced by the injection of suspending cadmium salt into mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 1982, 62(2), 219-227 (C.A. 96: 99033e).
170. Malecki E.A., Radzanowski G.M., Radzanowski T.J., Gallaher D.D., Greger J.L. – Biliary manganese secretion in conscious rats reflects acute and chronic manganese but not fat intake, *J. Nutr.*, 1996, 126, 489-498.
171. Mănescu S., Dumitrescu H., Bărduță Zenovia, Diaconescu Mona Ligia – Chimia sanitară a mediului, Vol. II – Solul și alimentele, Ed. Medicală, București, 1982.
172. Mănescu S., Cucu M., Diaconescu Mona Ligia – Chimia Sanitară a Mediului, Ed. Medicală, București, 1994.
173. Mănescu S., Tănăsescu G., Dumitrache S., Cucu M. – Igienă, Ed. Medicală, București, 1996.
174. McCarty J.T., Kumar R. – Chapter 4. Divalent Metabolism: Magnesium, pp. 41-43, in „Atlas of Disease of the Kidney”, (Berl T., Bonventre J.V. Eds.), Blackwell Science, Current Medicine Inc., Philadelphia, 1999.
175. McNeely M.D. – Nutrition, Vitamins, and Trace Elements, pp. 487-500, in “Applied Biochemistry of Clinical Disorders” (Gornall A.G. Ed.), 2nd Edition, Lippincott Comp., Philadelphia-London-New York, 1986;
176. McNulty T.J., Taylor C.W. – Extracellular heavy-metal ions stimulate Ca²⁺ mobilization in hepatocytes, *Biochem. J. (England)*, 1999, 339(pt 3), 555-561.

177. Mertz N. (Editor) – Manganese, in Trace elements in human and animal nutrition (Mertz N. editor), Vol. 1, 5th ed., New York, NY, Academic Press, 1987.
178. Mertz A., Mertz O. (Eds.) – ILSI-Risc Assessment of Essential Elements. ILSI Press, Washington DC, 1994.
179. Miller D. D. (editor) – Minerals, in Food Chemistry, pp. 617- 650. New York, Marcel Dekker Inc., 1996.
180. Miller K.B., Caton J.S., Schafer D.M., Smith D.J., Finley J.W. – High Dietary manganese Lowers Heart Magnesium in Pigs Fed a Low-Magnesium Diet, *J. Nutr.* 2000, 130, 2032-2035.
181. Mincu I. – *Tratat de dietetică*, Ed. Medicală, București, 1974.
182. Mincu I., Boboia D. – *Alimentația rațională a omului sănătos și bolnav*, Ed. Medicală, București, 1975.
183. Mincu I. – *Alimentația omului bolnav (Dietoterapia)*, Ed. Medicală, București, 1980.
184. Mincu I. – *Impactul om – alimentație*, Ed. Medicală, București, 1993.
185. Miu N., Drăgoteiu Gh. – *Magneziul în biologia și patologia umană*, Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, 2000.
186. Mogoș V.T. – *Sănătatea și substanțele minerale*, Ed. Albatros, București, 1993.
187. Mogoș V.T. – *Alimentația în bolile de nutriție și metabolism*, Vol. I, Ed. Didactică și Pedagogică R.A., București, 1997.
188. Moore R. – Bleeding gastric erosion after oral zinc sulfate, *Br. Med. J.*, 1978, 1, 754-756.
189. Mulhern S.A., Stroube W.B., Jacobs R.M. – Alopecia induced in young mice by exposure to excess dietary zinc, *Experientia*, 1986, 42, 551-553.
190. Murawska B., Szychaj-Fabisiak E. – Modification of sorption of light soils under conditions of long-term mineral fertilization, pp.90-95, in “Mengen- und Spurenelemente. 21 Arbeitstagung 2002”, Friedrich-Schiller-Universität Jena, (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 2002.
191. Murphy J.V. – Intoxication following ingestion of elemental zinc, *J. Amer. Med. Assoc.*, 1970, 212, 2119-2120.
192. Nash L. – Water quality and health, pp. 25-39, in “The Water Crisis” (Gleick P. Ed.), Oxford University Press, 1993.
193. Neamțu G. – *Biochimie alimentară*, Ed. Ceres, București, 1980.
194. Nicolini M., Zatta P.F., Corain B. (Eds.) – *Aluminium in chemistry, biology and medicine*, Series of Advances, Vol. I, Ed. Cortina International-Verona-Raven Press-New York, 1991.
195. Nielsen F.H. – Ultratrace Elements of Possible Importance for Human Health: An Update, pp. 355-376, in “Essential and Toxic Trace Elements in Human Health and Disease”, Wiley-Liss Inc., 1993.
196. Norheim Gunnar, Bjorland Jostein – Zinc concentrations in pancreas and liver of cattle in Norway, *Acta Vet. Scand*, 1981, 22(2), 286-288 (C.A. 96: 18942a).
197. Nowak B., Kowalska A. – Parameters characterising the changes of heavy metals concentration in the air and soil close to different emission sources, pp. 152-160, in “Mengen- und Spurenelemente. 21 Arbeitstagung 2002”, Friedrich-Schiller-Universität Jena, (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 2002.

198. Oberbaum M., Markovits R., Weissman Z., Klinkevits A., Bentwich Z. – Wound healing by homeopathic silica dilutions in mice, *Harefauh*, 1992, 123, 79-82.
199. Ondreicka R., Grinter E., Kortus J. – Chronic toxicity of aluminium in rats and mice and its effects on phosphorus metabolism, *Brit. J. Ind. Med.*, 1966, 23, 305-311.
200. Opresko D.M. – Toxicity Summary For Zinc And Zinc Compounds, Chemical Hazard Evaluation and Communication Group, Biomedical and Environmental Information Analysis Section, Health and Safety Research Division – Prepared for Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program, Oak Ridge, Tennessee, 1992.
201. Ostapczuk P., Schladot J.D., Emons H., Oxynos K., Schramm K.W., Grimmer G., Jacob J. – Environmental monitoring and banking of marine pollutants by using common mussels, *Chemosphere (England)*, 1997, 34(9-10), 2143-2151.
202. Patel R.P., Darley-Usmar V.M. – Molecular mechanisms of the copper dependent oxidation of low-density lipoprotein, *Free Radic. Es. (Switzerland)*, 1999, 30(1), 1-9.
203. Pearson D.A., Tan C.H., German J.B., Davis P.A., Gershwin M.E. – Apple juice inhibits low density lipoprotein oxidation, *Life Sci.*, 1999, 64(21), 1913-1920.
204. Pickett E.E. – Evidence for the essentiality of lithium in the rat, pp.66-70, in “4 Spurenelement Symposium Lithium” (Anke M., Baumann W., Bräunlich H, Brückner C. Eds.), Karl-Marx Universität Leipzig, Friedrich-Schiller Universität Jena, Werbedruck, Oberlungwitz, 1983.
205. Pickett E.E., O’Dell B.L. – Evidence for dietary essentiality of lithium in the rat, *Biol. Trace Elem. Res.*, 1992, 34, 299-319.
206. Pietrzyk D.J., Frank C.W. – Chimie analitică, Seria “Chimie analitică” (traducere din lb. Engleză), Ed. Tehnică, București, 1989.
207. Pollitt E. – Iron Deficiency and Cognitive Function, *Annual Review of Nutrition*, 1993, 13, 521-537.
208. Popa G, Stănescu V. – Controlul sanitar veterinar al produselor de origine animală, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1981.
209. Prasad A.S., Schulert A.R., Sandstead H.H., Miale Jr A, Farid Z. – Zinc, iron, and nitrogen content of sweat in normal and deficient subjects, *J. Lab. Clin. Med.*, 1963, 62, 84-89.
210. Prasad A.S., Brewer G.J., Schoemaker E.B., Rabbani P. – Hypocupremia induced by zinc therapy in adults, *J. Amer. Med. Assoc.*, 1978, 240, 2166-2168.
211. Pulley G.N., Moore E.L., Atkins C.D. – Grapefruit-cannery wasta yields crude citrus pectin, in *Food Industries*, 1944, 16, 285.
212. Pup Mihaela, Vincu (Ahmadi) Mirela – Synergistic and antagonistic aspects regarding metals in the human organism, p. 52, in Abstracts Volume: 5th International Symposium on “Metal Elements in Environment, Medicine and Biology”, Timișoara – Roumania, November 4-6, 2002.
213. Rannert O.M., Chan W.Y. (Eds.) – Metabolism of Trace Metals in Man, Vol. I, CRC Press, Boca Raton, 1981.
214. Rautela G.S., Hall R.G., Bekiesz C.L., Wermus G.R. – A kinetic method for the rapid and automatic measurement of triglycerides in biological fluids, *Clin. Chem.*, 1974, 20, 857.
215. Rhoades R., Pflanzner R. – Human Physiology, 2nd edition, Saunders College Publishing, Fortwort-Philadelphia-San Diego-New York, 1992.

216. Roels H., Meiers G., Delos M., Ortega I., Lauwerys R., Buchet J.P., Lison D. – Influence of the route of administration and the chemical form ($MnCl_2$, MnO_2) on the absorption and cerebral distribution of manganese in rats, *Arch. Toxicol.*, 1997, 71, 223-230.
217. Rokicki E., Chudzicka M., Krynski A., Adamowski A. – Mineral concentration of liver and antlers of roe deer depending on environmental relation, pp. 604-608, in “Mengen- und Spurenelemente, 20. Arbeitstagung 2000”, Friedrich Schiller Universität Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 2000.
218. Rondanelli M., Solerte S.B., Ferrari E. – Electrolytes and cognitive function in the elderly: relationship between serum sodium and chloride concentrations and psychometric test scores, *Panminerva Med. (Italy)*, 1998, 40(3), 191-195.
219. Rossander-Hultén L., Brune, M., Sandström, B., Lönnerdal, B., Hallberg L. – Competitive Absorbtion by Manganese and Zinc in Humans, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1991, 54, 152-156.
220. Sabbioni E., Pietra R., Fortaner S., Van der Venne M.T., Minola C. – The EURO TERVIHT (trace element references values in human tissues) project of the European Community (Environment Inst., Commision European Communities, Ispra, Italy – Akt. Anal. Okhr. Okruzh. Sredy., Dubna, 1993.
221. Saris N.E. – Revised IFCC method for aspartate aminotransferase, *Clin. Chem.*, 1978, 24, 720-721.
222. Satarug S., Baker J.R., Urbenjapol S., Haswell-Elkins Melissa, Reilly P.E.B., Williams D.J., Moore M.R. – A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population, *Toxicology Letters*, 2003, 137(1-2), 65-83.
223. Schäfer U. – Essentiality and toxicity of lithium, *J. Trace and Microprobe Techniques*, 1997, 15(3), 341-349.
224. Schilderman P.A., Moonen E.J., Kempkers P., Kleinjans J.C. – Bioavailability of soil-adsorbed cadmium in orally exposed male rats, *The Netherlands Environ. Health Perspect (United States)*, 1997, 105(2), 234-238.
225. Schrauzer G.N. – The Discovery of the essential trace elements. An outline of the history of biological trace element research, pp. 17-31, in “Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements” (Frienden Ed.), Plenum Press, New York – London, 1984.
226. Schroeder H.A., Nason A.P., Tipton I.H. – Essential trace metals in man. Relation to environmental cadmium, *J. Chron. Dis.*, 1967, 20, 179-210.
227. Schulka G.S., Schulka A. – Effect of Manganese on the levels of DNA, RNA, DNase and RNase in cerebrum, cerebellum and rest of brain regions of rat, *Acta Pharmacol. Et Toxicol.*, 1976, 39, 562-569.
228. Schulka A., Schulka G.S. – Effect of Latent Iron Deficiency on Metal Levels of Rat Brain Regions. *Biological Trace Elements Research*, 1989, 22, 141-152.
229. Schweigart H.A. – *Vitalstoff Lehre*, Veriag Hans Zauner Jr., Munich, 1962.
230. Sedki A., Lekouch N., Gamon S., Pineau A. – Toxic and essential trace metals in muscle, liver and kidney of bovines from a polluted area of Morocco, *The Science of the Total Environment*, 2003, 317(1-3), 201-205.
231. Segal Rodica – *Principiile nutriției – Alimentele și sănătatea*, Ed. Academică, Galați, 2002.

232. Shakirov F., Kamilov F.Kh., Farkhutdinov R.R., Likhovskikh V.A. – Changes in biochemical parameters of erythrocytes in workers engaged in pyromellitic dianhydride production, *Med. Tr. Prom. Ekol. (Russia)*, 1998, 9, 22-26.
233. Shamherger R.J. – The Insulin-Like Effects of Vanadium, *Journal of Advicery in Medicine*, 1996, 9(2), 14-16.
234. Shukla G.S., Singh A., Chandra S.V. – The interaction between manganese and ethanol in rats, *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)*, 1978, 43(5), 354-362.
235. Sissoeff I., Grisvard J., Guille E. – Studies on metal ions-DNA interactions: behaviour of reiterative DNA sequences, pp. 165-199, in “*Progr. Biophys. Molec. Biol.*”, Vol. 31, Pergamon Press, London, 1976.
236. Simek M., Sustala M., Vrzalova D., Zemanova D. – Effect of organic elements (Mn, Zn, Cu) on their availability (digestibility) in ration for ruminans, pp. 645-652, in “*Mengen- und Spurenelemente, 20. Arbeitstagung 2000*”, Friedrich Schiller Universitat Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 2000.
237. Simionovici M., Boesteanu Niculina, Cristescu Yvonne – *Lipide-Aspecte farmacodinamice, Centrala Industr. de Medicamente, Cosmetice, Coloranți și Lacuri, București*, 1982.
238. Slood W.N., Van der Sluijs-Gelling A.J., Gramsbergen J.B.P. – Selective lesions by manganese and extensive damage by iron after injection into rat striatum or hippocampus, *J. Neurochem.*, 1994, 62, 205-216.
239. Smith F.E., Herbert J., Gaudin J., Hennssy J., Reid G.R. – Serum iron determination using ferene triazine, *Clin. Biochem.*, 1984, 17, 306-310.
240. Smith B.B., Van Saun R.J., Reed P.J., Craig A.M., Youngberg A. – Blood mineral and vitamin E concentrations in llamas, *Am. J. Vet. Res. (United States)*, 1998, 59(8), 1063-1070.
241. Sosa Leon L.A., Hodgson D.R., Carlson G.P., Rose R.J. – Effects of concentrated electrolytes administrated via a paste on fluid, electrolyte, and acid base balance in horses, *Am. J. Vet. Res. (United States)*, 1998, 59(7), 898-903.
242. Spencer H., Asmussen C.A., Holtzman R.B., Kramer L. – Metabolic Balance of Cadmium, Copper, Manganese, and Zinc in man, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1979, 32, 1867-1875.
243. Stadtman T.C. – *Methods in Enzymology*, Vol. III (Colowick S.P. și Caplan N.O. Eds.), Academy Press, New York, NY, 1957.
244. Steindl W., Gamerith W., Lichtenegger F., Schindler E. – Statistical evaluation of measurements of lead and cadmium contents in bovine kidneys as part of a comprehensive monitoring program, *Dtsch. Lebensm.-Rundsch*, 1987, 83(11), 351-356 (C.A. 108: 73935s).
245. Steinmassl J. – How meat consumption benefices of a good nutrition, *Die Fleischerei*, 1994, 4, III-VII.
246. Stern J., Lewis W.H.P. – The colorimetric estimation of calcium in serum with o-cresolphtalein complexone, *Clin Chim Acta*, 1957, 2, 576-580.
247. Stokinger H.E. – The Metals, pp. 1749-1769, in “*Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*”, 3rd rev. ed., Vol 2A, (Clayton G.D., Clayton F.E. Eds.), John Wiley & Sons, New York. 1981a.

248. Stokinger H.E. – Zinc, pp. 2033-2049, in “Patty's Industrial Hygiene and Toxicology”. 3rd rev. ed., Vol 2A, (Clayton G.D., Clayton F.E. Eds.), John Wiley & Sons, New York, 1981b.
249. Strikauska S., Ozola V., Berzins A., Latvietis J. – Lead and cadmium as a nutritional hazard to farm livestock, pp. 295-297, in “Mengen- und Spurenelemente, 15. Arbeitstagung 1995”, Friedrich Schiller Universitat Jena (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1995.
250. Subhash M.N., Padmashree T.S. – Regional distribution of dopamine β -hidroxylase and monoamine oxidase in the brains of rats exposed to manganese. Food chemistry and toxicology, 1990, 28, 567 – 570.
251. Sutton W.R., Nelson V.E. – Studies on zinc, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1937, 36, 211-213.
252. Șerban M., Câmpeanu G., Ionescu Emanuela – Metode de laborator în biochimia animală. Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1993.
253. Șerban M., Roșoiu Natalia – Substanțe biologice-active din organisme marine, Ed. Academiei Române, București, 1992.
254. Talke H., Schubert G.E. – Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und serum in optzischen Test nach Warburg, Klin Wschr, 1965, 41, 174.
255. Teodorescu E. I. (Ed.) – Patologie biochimică, Ed. Medicală. București, 1982.
256. Tietz N.W. – Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA, 1994.
257. Tipton I.H., Cook M.J. – Trace elements in human tissue. Part II, Adult subjects from the United States, Health Physics, 1963, 9, 103-145.
258. Tsunajima T., Tatsuki R., Satch K., Yamamoto A., Hoshi K., Ichihara K., Research Communications in Molecular Pathology & Pharmacology, 1997, 98(2), 190-200.
259. Țurcanu P. – Medicina muncii, Curs Lito Institutul de Medicină Timișoara, 1978.
260. Underwood E.J. – Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 4th Edition, Academic Press, New York-London, 1977.
261. Urai Z. – Ghid de date biologice ale animalelor de laborator, Cap. 5, pp. 111-149, în “Biologia animalelor de laborator și oncologie comparată”, Colecția Enciclopedia oncologică, Vol. 19, (Eds. Chiricuță I., Bologa S., Rișcă R., Ghergariu S.), Imprimeria “Ardealul” Cluj-Napoca, 1992.
262. Vainio H. – Lead and cancer – asociation or causation?, Scan J. Work Environ. Health, 1997, 23(1), 1-3.
263. Venchikov A.I. – Trace Element Metabolism in Animals (Ed. Hoekstra W.G.), Vol. 2, pp. 289-310, University Park Press, Baltimore, Maryland, USA, 1974.
264. Venerini V., Sette M., Stroppolo M.E., De Martino A., Desideri A. – Characterisation of the spectroscopic properties of the Cu, Co cluster in a prokaryotic superoxide dismutase, Arch. Biochem. Biophys. (United States), 1999, 366(1), 70-74.
265. Verma S., Cam M.C., McNeill J.H. – Nutritional factors that can favorably influence the glucose-insulin system: vanadium, Journal of Americal College of Nutrition, 1998, 17(1), 11-18.
266. Vincu Mirela, Sarafolean S., Ilie D., Pleșca Dana, Gârban Z. – Cercetări preliminare privind distribuția biometalelor în organismul uman și în unele produse alimentare de origine animală, pp. 223 – 232, în Anuarul “Cercetări Științifice – Științe, procese și

- tehnologii agroalimentare”, Vol. IV, Universitatea “S.A.M.V.B.” Timișoara, Ed. „Agroprint”, Timișoara, 1998;
267. Vincu Mirela, Avacovici Adina, Moț Maria, Pup Mihaela, Creț Iuliana, Manu Rodica – Model experimental pentru investigarea acțiunii unor oligoelemente metalice, p. 201-206, în “Cercetări științifice – Procese și tehnologii agroalimentare”, Seria V, Ed. Agroprint, Timișoara, 1999a.
268. Vincu Mirela, Gârban Z., Sarafolean S., Mircov V., Moldoveanu Mihaela, Creț Iuliana, Burueanu Tatiana – Conceptul de biodisponibilitate: semnificație și aplicații. II. Biodisponibilitatea în relație cu nutriția umană, p. 131-136, în “Lucrările Simpozionului Științe, Procese și Tehnologii Agro-alimentare”, Zilele Academice Timișene, Ed. A VI-a, 27-28 mai 1999, Ed. Mirton, Timișoara, 1999b.
269. Vincu Mirela, Sarafolean S.G., Precob V., Gârban Z., Pup Mihaela, Ehling Șt. – Investigații asupra distribuției unor bioelemente și a unor elemente cu potențial toxicogen din organe de la animale domestice, pp. 411-415, Anuarul “Cercetări Științifice: Progrese și Tehnologii Agroalimentare”, Vol. VI, Universitatea “S.A.M.V.B.” Timișoara, Ed. “Eurostampa”, Timișoara, 2000a.
270. Vincu Mirela, Clep Camelia, Ahmadi T., Pup Mihaela, Popescu Georgeta Sofia, Martău Ariana-Bianca, Velcirov P., Palcu S.E., Chilom Marinela – Experimental studies on the metabolic effects induced by zinc in laboratory animals, p. 313-316, in Proceedings of the 4th International Symposium “Metal Elements in Environment, Medicine and Biology”, Timișoara – Roumania, November 6-8, 2000b.
271. Vincu Mirela, Precob V., Dumitru M., Daranyi Gabriela, Gârban Z. – Trace elements and the biochemical homeostasis of some metal ions and enzymes in the blood serum of laboratory animals. Note I. Preliminary data concerning the effects of Zn and Mn, pp. 189-200, in “New perspectives in the research of hardly known trace elements and the importance of the interdisciplinary cooperation, 9th International Trace Element Symposium (Ed. I. Pais), Budapest, 2000, Publ. Szt Istvan University, Faculty of Foss Science, Budapest, 2001.
272. Vincu (Ahmadi) Mirela, Gârban Z., Pup Mihaela, Martău Ariana-Bianca, Simionescu E., Popescu Georgeta-Sofia – Retention of some trace elements and heavy metals in kidney of laboratory animals after administration of Zn and Mn chloride salts, pp. 17-22, Anuarul “Cercetări Științifice: Progrese și Tehnologii Agroalimentare”, Vol. VII, Universitatea “S.A.M.V.B.” Timișoara; Ed. “Eurostampa”, Timișoara, 2002.
273. Vincu (Ahmadi) Mirela, Gârban Gabriela, Pup Mihaela, Gârban Z., Clep Camelia, Martău Ariana-Bianca – Manganese overdose effects on some blood serum electrolytes in Wistar strain rats, pp. 399-402, in International Symposium “Euroalimint” 23-25 octombrie Galați, 2003a.
274. Vincu (Ahmadi) Mirela, Pup Mihaela, Gârban Gabriela, Clep Camelia, Martău Ariana-Bianca, Gârban Z., Ahmadi T. – Experimental investigations concerning the effects induced by zinc on some biometals and metals with toxicogen potential in hearth of laboratory animals, pp. 263-266, in Anuarul “Cercetări științifice: Progrese și Tehnologii Agroalimentare”, Vol. IX, Universitatea “S.A.M.V.B.” Timișoara, Ed. Agroprint Timișoara, 2003b.
275. Vizzard M., Maffei P. – Formagi Italiani – Storia e tecniche di preparazione, Edizioni Agricole, Roma, 1996.

276. Volpi Nicola, Tarugi Patrizia - The protective effect on Cu²⁺- and AAPH-mediated oxidation of human low-density lipoproteins depends on glycosaminoglycan structure, *Food Chemistry*, January 2001, 72(1), 89-95
277. Walters M., Roe F.J.C. – A study of the effects of zinc and tin administered orally to mice over a prolonged period, *Food Cosmet. Toxicol.*, 1965, 3, 271-276.
278. Wang W., Post J.I., Dow K.E., Shin .H., Riopelle R.J., Ross G.M. – Zinc and copper inhibit nerve growth factor-mediated protection from oxidative stress-induced apoptosis, *Neurosci. Lett. (Ireland)*, 1999, 259(2), 115-118.
279. Watts D.L. – The nutritional relationships of magnesium, *J. Orthomol. Med.*, 1988, 3(4), 197-201.
280. Weisell R.C. – Assessment and Evaluation Service of the Food Policy and Nutrition Division, FAO, Salient issues from the Joint FAO/WHO/IAEA Expert Consultation on Trace Elements in Human Nutrition, Geneva, 1992.
281. William A.H. – Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc, *Meat Science*, October 2003, 65(2), 677-691.
282. Wolf W.R. – Trace element analysis in food, pp 427-446, in “Clinical, Biochemical and Nutritional Aspects of Trace Elements” (Prasad A.S. Ed.), Alan Liss Inc, New York, US, 1982.
283. Wroblewski F., LaDue J.S. – Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, 91, 569.
284. Yokoi K. – Effect of Dietary Iron deficiency on Mineral Levels in Tissues of Rats. *Biological Trace Element Research*, 1991, 29, 257-265.
285. Yölmaz H., Yavuz O. – Content of some trace metals in honey from south-eastern Anatolia, *Food Chemistry*, 1999, 65, 475-476.
286. Yuan M., Yu B., Liang Y. – Effects of peroxovanadate complexes on reducing glycemia in diabetic rats and translocation of glucose transport, *Medical Journal*, 1997a, 110(9), 715-719.
287. Yuan M., Yu B., Liang Y. – Hypoglycemic effects of peroxovanadate complexes on glucose transport of diabetic rats, *Medical Journal*, 1997b, 77(3), 208-211.
288. Yucesoy B., Turhan A., Ure M., Imir T., Karakaya A. – Simultaneous effects of lead and cadmium on NK cell activity and some phenotypic parameters, *Immunopharmacol. Immunotoxicol. (United States)*, 1997, 19(3), 339-348.
289. Zaloglu N., Yildirim G., Bastug M., Koç E., Fiçicilar H., Sayal A. – High dosage of manganese chloride application and iron zinc copper status in rats, *Trace Elements and Electrolytes*, 2002, 19(3), 138-142.
290. Zorbas Y.G., Federenko Y.F., Naexu K.A., Kuznetsov N.K., Petrov K.L. – Water and electrolyte excretion in rats during prolonged restriction of motor activity and chronic hyperhydration, *Physiol. Chem. Hys. Med. NMR (united States)*, 1998, 30(1), 99-111.
291. * * * Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) – Toxicological Profile for Zinc. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Public Health Service, Atlanta, ATSDR/TP-89-25, 1989.
292. * * * Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) – Toxicological profile for manganese. Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, 1992.

293. * * * Aspects sanitaires et nutritionnels des oligo-éléments et des éléments en traces. Ed. OMS, Genève, Publ. InfoPrint Singapour, 1997.
294. * * * Colecția de Standarde pentru Industria Cărnii, Departamentul Industriei Alimentare, Centrala Industrializării cărnii, Centrul de Organizare, Calcul și Perfecționarea cadrelor pentru Industria alimentară, București, 1985.
295. * * * Colecție de Standarde de Ramură – Conserve și Semiconserve de Pește, Ministerul Agriculturii și Alimentației, București, 1991.
296. * * * Expert Group on Vitamins and Minerals Meeting – Nutrition Unit A, JFSSG MAFF – Review of Manganese, pp. 1-48, EVM / 99 / 22. Revised Aug. 2002, (<http://foodstandards.gov.uk/multimedia.pdfs>).
297. * * * Food and Agriculture – Meat, Catalogue of Certificate Reference Materials 2000-2001 (<http://www.labo.cz/chemmea/katalog/index.htm>).
298. * * * Food and nutrient intakes of British infants, Great Britain, 1986.
299. * * * Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed., Vol. 1 – Recommendations, World Health Organization, Geneva, 1993.
300. * * * Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed., Vol 2 – Health criteria and other supporting information, Publ. by World Health Organization, Geneva, 1996.
301. * * * Health Effects Support Document for Manganese – External Review Draft, Contract Number: 68-C-01-002, Work Assignment Number: B-02, Prep. for U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Health and Ecological Criteria Division Washington, Sciences International Inc., EPA-R-02-029, April, 2002.
302. * * * Handbook of the Nutritional Contents of Foods – United States Department of Agriculture, Dover Publications, Inc., New York, 1977.
303. * * * Institute of Medicine (IOM) – Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon and Vanadium, National Academy Press, Washington, 2001.
304. * * * Manualul Inginerului Chimist, Vol. 1, Ed. Tehnică și Pedagogică, București, 1972.
305. * * * Monitorul Oficial al României, Nr. 552, Data 29.07.2002, Legea 458 / 2002 – Calitatea apei de rețea.
306. * * * MOST – The USAID Micronutrient Program – Improving Iron Status through Diet: The Application of Knowledge Concerning Dietary Iron Bioavailability in Human Populations, no. 8, 1997 (<http://www.mostproject.org/toc.htm>).
307. * * * National Research Council (NRC) – Recommended Dietary Allowances, 10th ed, National Academy Press, Washington DC., 1989.
308. * * * Nutrition – Documenta Geigy, Tiré à part de la 7e édition des Tables scientifiques, Ciba-Geigy S A, Bâle, 1973.
309. * * * OTC – The OTC Directory 2001 – 2002. Proprietary Association of Great Britain, 2001.
310. * * * Recommended Dietary Allowances-Human Nutrition, Microsoft® 99 Encyclopedia. (C) 1993-1997.
311. * * * Scientific Committee on Food (SFC) – Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Manganese., 2000 (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out80_en.html).

312. * * * Institutul de Standardizare, Calitatea apei de adâncime provenită din foraje, București, 1991.
313. * * * The Natural Water, Spring Water and Bottled Drinking Water Regulations, Great Britain, 1999.
314. * * * The Private Water Supplies Regulations, Great Britain, 1991.
315. * * * Total Diet Study: Metals and other Elements, Food Surveillance Information Sheet Nr. 131, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1997.
316. * * * United States Department of Agriculture – Nutrient Database for Standard Reference, 2003 (<http://www.cs.princeton.edu/~ah/food/data>).
317. * * * United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) – Health Effects Assessment for Zinc (and Compounds). U.S Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Washington, DC. EPA/540/1-86-048, 1984.
318. * * * United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) – Integrated Risk Information System (IRIS). Carcinogenicity Assessment for Zinc and Compounds, and Oral RfD Assessment for Zinc phosphide. Office of Health and Environmental Assessment, Cincinnati, OH, 1991.
319. * * * United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) – Health effects assessment summary tables. FY 1992 Annual. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington DC, 1992.
320. * * * United States Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Draft Toxicological Profile for Manganese Update, 1997;
321. * * * Water, Sanitation and Hygiene Monitoring Project (WaSH MP), No. 2, 17 Sept 2003.
322. * * * World Health Organization (WHO) – Technical Report Series, No. 617, 1977.
323. * * * World Health Organization (WHO) – Bulletin of the World Health Organization, Geneva, 1991, 69(5), 609-621.
324. * * * World Health Organization (WHO) – Guidelines for drinking-water quality (2nd Edition), Volume 3: surveillance and control of community supplies. W.H.O., Geneva, 1997, 3-11 and 42-50.
325. * * * World Health Organization (WHO) – Global Water Supply and Sanitation Assessment 2000, Report. 2000 (http://www.who.int/water_sanitation_health/Globassessment/Global-TOC.htm)

