

Scrisoare către Colegi

Asociația Națională a Distribuitorilor de Produse de uz Veterinar din Romania

Nr.04 din: 03.03.2014

Stimate Coleg / Stimate Colegă

Pentru că sunt multe probleme legate în activitatea pe care o desfășurați și pentru că fiecare în parte nu le poate rezolva, vă invităm să vă alăturați **Asociației Naționale a Distribuitorilor de Produse de Uz Veterinar din Romania.**

Dacă **nu** sunteți mulțumit / mulțumită de modul în care sunteți tratați de reprezentanții Direcțiilor Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor și vă simțiți discriminat / discriminată față de medicii veterinari care lucrează în alte locuri de muncă, decât farmaciile veterinare, de prevederile actelor normative referitoare la exercitarea drepturilor și competențelor D-voastră profesionale, conferite de diploma de medic veterinar pe care o dețineți, în funcția de medic veterinar farmacist, vă invităm să completați adeziunea anexată acestei scrisori pentru a deveni membru a Asociației Naționale a Distribuitorilor de Produse de Uz Veterinar din Romania.

Este important pentru D-voastră să deveniți membru al ANDPUVR pentru că aceasta prin statutul sau are drept obiectiv sa va reprezinte legal și să vă apere interesele profesionale, în aceasta etapă, în relațiile cu Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor la elaborarea actelor normative în domeniu.

În situația în care printr-un act normativ sunt încălcate drepturile D-voastră legale,

ANDPUVR poate ataca în contencios acel act normativ și obține suspendarea acțiunii acestuia.

În ultimele două decenii numărul medicilor veterinari- farmaciști a crescut de la un an la altul, ajungând în anul 2013 la numărul de 1175.

În absența unei structuri organizatorice legale, la nivel national, care să le reprezinte, interesele profesionale acestia nu au fost o prioritate pentru ANSVSA și alte organisme ale profesiei. Marturie a celor afirmate o reprezinta si ultimul act normativ emis de ANSVSA in domeniu, respectiv Ordinul nr.86/16.10.2013.

Structura organizatorică legală care și-a asumat rolul de a apăra interesele tuturor distribuitorilor de produse de uz veterinar de furaje pentru animale și utilități pentru animalele de companie respectiv societățile comerciale, persoane fizice autorizate și medici veterinari care lucrează în acestea este ANDPUVR.

Este unanim recunoscut că într-o economie concurențială de piață, o structura organizatorică profesională reprezentativă la nivel național este o necesitate stringentă, ca partener legal de dialog social. In contextul menționat pentru a vă face oficial auzită vocea și necesitățile profesionale trimiteți adeziunea D-voastră de aderare la ANDPUVR pe adresa: **Prof. Univ. Dr. Teușdea Valer**, Calea Giulești 333, Sect. 6 București, pe fax la numerele: 0212202511; 0212205315 sau prin e-mail la: valerteusdea@yahoo.com.

ANDPUVR, va fi cu atât mai puternică și reprezentativitatea ei mai mare, cu cât va avea mai mulți membri.

Cotizația, simbolică, pentru medicii veterinari, persoanele fizice autorizate

este de: **5 lei / luna**, iar pentru o farmacie sau lanț de farmacii de **10 lei / luna**.

0744510070 sau la **e-mail și fax-uri** menționate.

Cu stima,

Pentru adeziunile Dvs. (atașat mai jos), orice amănunte, propuneri și/sau alte sugestii puteți apela la tel:

Director executiv
Prof.univ.dr. Valer Teușdea



A D E Z I U N E

Subsemnatul în calitate de medic veterinar / farmacist la,
îmi exprim prin prezenta dorința să devin membru asociat al **Asociației Naționale a Distribuitorilor de Produse de uz Veterinar din România** începând cu data de

Datele mele de contact sunt următoarele:

Adresa

Telefon

E-mail

Fax

Semnătura,

Data

Nou!

FASCIOZONE

suspensie orală antiparazitară
OXICLOZANID

EFICIENT ÎN TRATAMENTUL ȘI CONTROLUL:

- ▶ **FASCIOLOZEI**
- ▶ **PARAMFISTOMOZEI**
- ▶ **CESTODOZELOR**



Timp de așteptare la lapte:

0
zile

FarmaVet[®]
Fondat 1955

Distribuitor: S.C. Farmavet S.A.
Calea Giulești nr. 333, Sector 6, 060269 București
Office@farmavet.ro
Tel. 021/221.99.60, 021/220.69.09 Fax 021/220.69.32

producător
Pasteur
Filipești
ROMÂNIA

▼ *Educație continuă / Continuous education*

Raport privind controlul calității microbiologice a produselor farmaceutice veterinare în anul 2013

Report regarding the microbiological quality control of the veterinary pharmaceutical products during 2013

Simona Sturzu, Daniela Tirsinoaga, Ioana Tihulca, Mariana Dumitrache, Alina Karina Draghici
Institute for Control of Veterinary Biological Products and Medicines

Cuvinte cheie: *produs farmaceutic, control microbiologic, Farmacopea Europeana*

Key words: *pharmaceutical product, microbiological control, European Pharmacopoeia*

Rezumat

Contaminarea microbiană a produselor farmaceutice poate avea consecințe majore asupra caracteristicilor fizico – chimice, siguranței și eficacității produselor medicinale, precum și asupra costurilor asociate rechemării produselor neconforme. Controlul calității produselor farmaceutice trebuie să fie un obiectiv major atât pentru industria farmaceutică cât și pentru laboratoarele oficiale pentru controlul calității, iar rezultatele finale ale acestor controale trebuie să ofere date cât mai exacte asupra siguranței și eficienței produselor farmaceutice controlate. În acest raport se prezintă rezultatele obținute în anul 2013 în cadrul laboratorului Control microbiologic în urma efectuării controlului calității produselor ținând cont de formele farmaceutice și grupa terapeutică a produselor testate.

Abstract

The microbiological contamination of pharmaceutical products could have major consequences on the physical – chemical characteristics, safety and efficiency of the medicinal products and also on the out of specification products recall-associated costs. Quality control of the pharmaceutical products should be a major objective for both the pharmaceutical industry as well as for the official quality control laboratories and the final results of these tests should provide most accurate data regarding the safety and the efficiency of the controlled pharmaceutical products. This report is presenting the results which were obtained in 2013 in the Microbiological Control Laboratory following the quality control of the products according to their pharmaceutical form and therapeutical class.

Introducere

Domeniul microbiologiei farmaceutice constituie unul din cele mai importante domenii ale industriei farmaceutice și are un rol major în stabilirea principalelor obiective cheie în garantarea siguranței pacienților și a calității produsului.

Farmacopeea Europeană stabilește un set de cerințe asupra metodologiilor standardizate de testare și specificații clare referitoare la calitatea și controlul microbiologic al produselor medicinale [1].

În laboratorul Control microbiologic, din cadrul I.C.B.M.V., se efectuează o serie de analize atât pentru produsele farmaceutice sterile cât și pentru produsele farmaceutice

nesterile, conform legislației [2-5] după cum urmează:

1. determinarea substanțelor active prin metoda difuzimetrică - produse farmaceutice sterile și nesterile.
2. determinarea numărului total de bacterii aerobe - produse farmaceutice nesterile
3. determinarea numărului total de fungi - produse farmaceutice nesterile.
4. determinarea numărului bacterii gram negative bilă - tolerante - produse farmaceutice nesterile.
5. determinarea patogenilor specifici (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Salmonella*, bacterii gram negative bila tolerante) - produse farmaceutice nesterile.

6. controlul sterilității produselor farmaceutice injectabile, oftalmice, injectoare intra-mamare, etc.

Unul dintre principalele obiective al laboratorului Control microbiologic pentru anul 2013 a fost efectuarea controlului calitatii pentru parametrii microbiologici pentru produsele farmaceutice veterinare cuprinse in **Planul de prelevare și testare, in conformitate cu cerintele Farmacopeei europene**, în condițiile respectării standardelor și procedurilor privind asigurarea calitatii rezultatelor [2-5].

Pe lângă obiectivul menționat anterior, un alt obiectiv important l-a constituit controlul calității produselor farmaceutice veterinare aflate în diferite etape ale procedurii de obținerea autorizației de comercializare [2-5].

Pentru realizarea obiectivelor privind controlul calitatii produselor primite în laboratorul de microbiologie s-a studiat specificația parametrilor de calitate inclusă în documentația tehnică a fiecărui produs în parte, s-au efectuat analizele de laborator in conformitate cu cerințele Farmacopeei Europene, s-au analizat rezultatele obținute și s-au întocmit buletinele de analiza.

Astfel în 2013 au fost primite pentru control de laborator un număr total de **122 de serii de produse farmaceutice veterinare (366 probe)**, din care 114 serii au fost prelevate și testate în cadrul Programului de supraveghere și control și un număr de 8 serii au fost testate in etapa de obținere a autorizației de comercializare a produselor respective. În urma centralizării situației privind rezultatele obținute la controlul microbiologic, s-a constatat că toate cele 122 serii controlate **au fost conforme** pentru toti parametrii.

S-a remarcat, de asemenea, că activitatea de laborator a crescut în 2013, față de anul 2012 cu **34,07%**.

Produsele farmaceutice veterinare testate în cadrul Programului de supraveghere și control au reprezentat în anul 2013, **93,44%** din totalul produselor

farmaceutice veterinare controlate în cadrul laboratorului control microbiologic.

Diferența de 6,56% fiind reprezentată de produsele farmaceutice veterinare aflate în diferite etape ale procedurii de obținere a autorizației de comercializare (Figura 1).

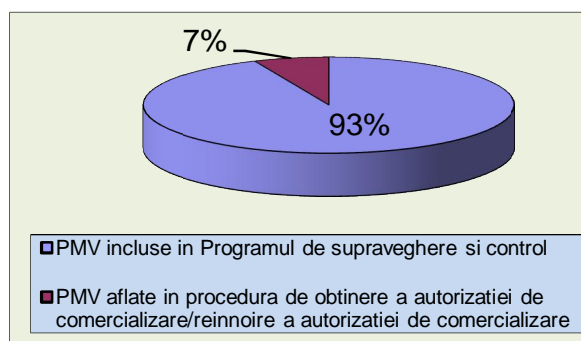


Figura 1. Situația comparativă a controlului microbiologic pentru produsele testate în anul 2013

În ce privește structura analizelor microbiologice, în funcție de forma farmaceutică, (Figura 2) s-a constatat că în anul 2013:

- 29,51 % au fost produse parenterale,
- 14,75 % au fost comprimate și tablete,
- 2,46 % au fost pesarii și suspensii pentru administrare intravaginală,
- 13,11 % au fost unguente, suspensii și creme de uz topic,
- 18,03% au fost pulberi,
- 18,85% au fost solutii, suspensii și paste orale,
- 3,28% au fost premixuri.

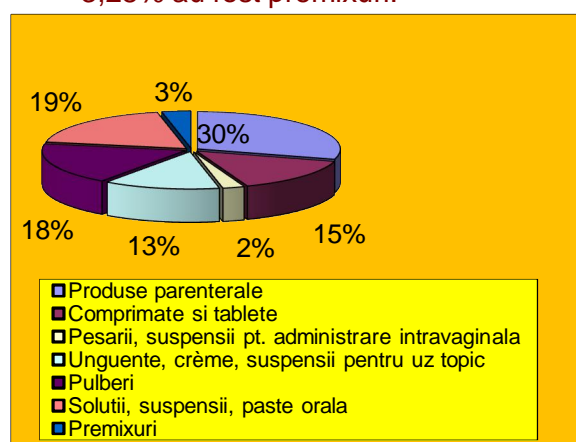


Figura 2. Situația comparativă a controlului microbiologic în funcție de forma farmaceutică a produselor testate în anul 2013

Sub aspectul structurii analizelor de laborator în funcție de grupa terapeutică (Figura 3) situația pentru anul 2013 este următoarea:

- 44,26 % antibiotice;
- 27,87 % antiparazitare;
- 8,2 % chimioterapice;
- 3,28 % antiinflamatoare,
- 2,46 % anestezice;
- 2,46 % hormonale;
- 0,82 % sedative;
- 0,82 % spasmolitice și
- 9,84% alte produse a.u.v.

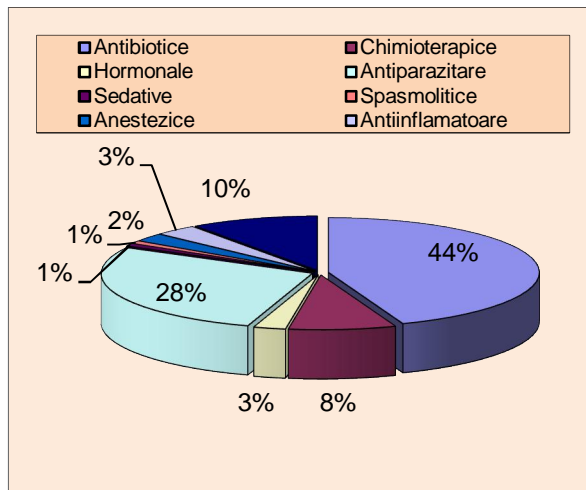


Figura 3: Situația comparativă a controlului microbiologic în funcție de grupa terapeutică aferentă produselor testate în anul 2013

Analiza produselor farmaceutice aflate în control de laborator în anul 2013, ținând cont de parametrii microbiologici controlați (Figura 4), a stabilit că din totalul a 338 determinări microbiologice:

- 9,76% au fost determinări de substanțe active prin metoda difuzimetrică,
- 7,4% pentru controlul sterilității,
- 24,56% pentru determinarea numărului total de germeni,
- 24,56% pt. determinarea numărului total de fungi,
- 20,12% pt. evidențierea *E. coli*;
- 5,92% pt. evidențierea *St. aureus*,
- 5,62% pt. evidențierea *Ps. aeruginosa*,

- 0,89 % pt. evidențierea *C. albicans*,
- 0,59 % pt. evidențierea Bacteriilor Gram negative bila-tolerante,
- 0,59% pt. evidențierea *Salmonella spp.*

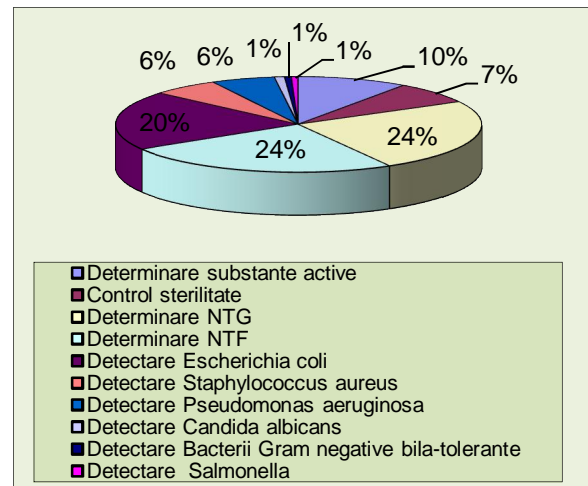


Figura 4. Situația comparativă a controlului de laborator în funcție de determinările microbiologice aferente produselor testate în anul 2013

În cadrul laboratorului se efectuează controlul microbiologic pentru toate formele farmaceutice și pentru toate categoriile terapeutice de produse farmaceutice veterinare, în conformitate cu cerințele stipulate în Farmacopeea Europeană [1].

Analizii din cadrul laboratorului au participat la o serie de instruirii în laboratoare de profil în Germania pentru următoarele metode [6]:

- testul de sterilitate,
- determinarea numărului total de bacterii aerobe,
- determinarea numărului total de fungi,
- identificarea microorganismelor specific patogene,
- validarea metodelor microbiologice,
- verificarea sterilității și eficienței mediilor de cultură.

Laboratorul de Microbiologie a obținut acreditarea de către RENAR pentru toate metodele de control microbiologic a produselor farmaceutice, iar în luna iunie 2014, va fi auditat de către experții desemnați de către Directoratul european

pentru calitatea medicamentelor (European Directorate for Quality of Medicines - EDQM).

De asemenea, din 2008, specialiștii din cadrul laboratorului participa constant la activitățile rețelei Laboratoarelor Oficiale de Control a Medicamentelor (OMCLnet):

- studii colaborative,
- studii de comparare interlaboratoare,
- prelevare / testare produse farmaceutice veterinare în cadrul programelor europene de control, audit reciproc (MJA), etc.

Bibliografie

1. Farmacopeea Europeana, editia a 7 a.
2. Ordin ANSVSA nr. 187/2007 pentru aprobarea Normei sanitare veterinare privind Codul produselor medicinale veterinare
3. Ordin ANSVSA nr. 187/2007 pentru aprobarea Normei sanitare veterinare privind Codul produselor medicinale veterinare cu modificarile si completarile ulterioare
4. Hotărârea de Guvern nr. 1156/2014, care aprobă Programului acțiunilor de supraveghere, prevenire, control și eradicare a bolilor la animale, a celor transmisibile de la animale la om, protecția animalelor și protecția mediului, de identificare și înregistrare a bovinelor, suinelor, ovinelor și caprinelor pentru anul 2012
5. Ordin ANSVSA nr. 29 / 2014 pentru aprobarea Normelor metodologice de aplicare a Programului de supraveghere și control în domeniul siguranței alimentelor
6. Testarea produselor medicinale pe baza analizei riscului - PA/PH/OMCL(07) 6R / Rețeaua Laboratoarelor Europene Oficiale de Control (OMCL network).

**NOUA FABRICĂ DE MEDICAMENTE
A COMPANIEI FARMACEUTICE
DELOS**



- Certificată GMP
- Organizată pentru producerea medicamentelor pulverulente și soluțiilor orale bazată pe folosirea unor tehnologii și utilaje moderne



- Secții de producție moderne utilizate complet:



Secția de producție soluții orale – vase de preparare soluții

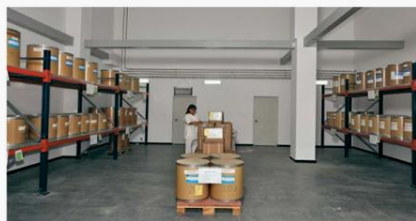


Linia de umplere a flacoanelor



Secția de producție medicamente pulverulente

- Depozite moderne:



- de materii prime cu temperatură și umiditate controlate



- de produse finite cu temperatură și umiditate controlate



S.C. DELOS IMPEX 96 SRL
Str. Horia, Cloșca și Crișan, nr. 81, Otopeni, Jud. Ilfov, Cod 075100
J23/3758/2008 RO 8086792
TEL +40 372 714 433; +40 372 714 434 FAX +40 372 871 445
Cont: BRD fil. Carol – RON: RO57BRDE4413V14535894410
Cont: Volksbank fil. Mosilor – RON: RO69VBBU2511MO0342522701
E-mail: delosmedica@yahoo.com

Raport privind rezultatele testului de competență a laboratoarelor pentru determinarea nivelului de microorganisme din produsele farmaceutice

Report concerning results of laboratory proficiency testing on microbial enumeration level from pharmaceutical products

Simona Sturzu, Daniela Tirsinoaga, Ioana Tihulca, Mariana Dumitrache, Alina Karina Draghici
Institute for Control of Veterinary Biological Products and Medicines

Cuvinte cheie: *schema de competenta a laboratoarelor, comparări inter-lab, filtrare prin membrana, determinarea numărului de microorganisme*

Key words: *proficiency testing schemes (PTS), Inter-Lab Comparisons, membrane filtration, microbial enumeration*

Rezumat

Lucrarea descrie rezultatele obtinute de catre Laboratorul Control Microbiologic din cadrul Institutului pentru Controlul Produselor Biologice si Medicamentelor de uz Veterinar dupa participarea la shema de competenta a laboratoarelor pentru determinarea numarului total de microorganisme prin metoda microbiologica (PTS 274). Schema de competenta a laboratoarelor a fost organizata de catre LGC Standards, Marea Britanie, organizatie cu competenta in organizarea shemelor de competenta a laboratoarelor. Tehnica microbiologica utilizata la determinarea numarului de germeni a fost filtrarea prin membrana care consta in transferarea unei cantitati adecvate din proba, preparată conform prevederilor Farmacopeei Europene, prin membrana filtranta, incubarea acestora pe medii corespunzatoare, urmata de citirea si interpretarea rezultatelor. Rezultatul obtinut de catre Laboratorul Control Microbiologic a fost de 34 UFC/flacon, iar valoarea atribuita de LGC Standards a fost de 30 UFC/flacon. Scorul Z obtinut a fost 0,16, iar performanta Laboratorului Control Microbiologic a fost apreciata ca fiind foarte buna pentru determinarea numarului minim de microorganisme.

Abstract

The present study describes the results obtained by the Microbiological Control Laboratory from Institute for Control of Biological Products and Veterinary Medicines after participating in the proficiency testing scheme study on low – level microbial enumeration from pharmaceutical products. The proficiency testing scheme was organized by LGC Standards, Great Britain, organisation with competences in managing of the proficiency testing scheme for laboratories. Membrane filtration is a microbiological technique used for the microbial enumeration test, which consist in the transfer of the appropriate amounts from the sample, prepared according to the provisions of the European Pharmacopoea, through a membrane filter, incubating it on appropriate culture media, followed by reading and interpretation of the results. The result obtained by the Microbiological Control Laboratory was 34 CFU/vial, and the value attributed by LGC Standards was 30 CFU/vial. The Z- scores were 0,16 and the performance of Microbiological Control Laboratory was very good for low – level microbial enumeration from sample.

Introducere

Participarile la teste de competenta (teste de evaluare intre laboratoare) sunt considerate obligatorii pentru laboratoarele acreditate conform cerintelor standardului ISO/IEC 17025.

Verificarea rezultatelor analizelor cu cele obtinute de alte laboratoare este una din cele mai importante elemente ale controlului calitatii.

Increderea ca un laborator produce constant rezultate fiabile este de o importanta majora pentru laborator in sine si pentru organizatia din care face parte.

Laboratorul Control Microbiologic din cadrul ICBMV participă regulat la schemele de competență organizate de către Directoratul European pentru Calitatea Medicamentelor (EDQM).

La testul de competența (PTS 274) cele 38 laboratoare participante au trebuit să determine conținutul de microorganisme din probele de produse farmaceutice, conform cerințelor cuprinse în Farmacopeea Europeană, ediția a 7-a, capitolul 2.6.12. [1].

1. Materiale și Metodă

Principii generale

Tehnica utilizată pentru determinarea nivelului minim de microorganisme aerobe din proba a fost **filtrarea prin membrana**.

Tehnica permite determinarea cantitativa a bacteriilor mezofile și a fungilor care pot crește în condiții de aerobioză și trebuie executată ținând cont de toate măsurile de precauție, pentru a evita contaminarea cu microorganisme a probei de examinat.

Principiul metodei are la baza concentrarea microorganismelor din probele analizate pe suprafața membranei filtrante (diametrul porilor de cel mult 0,45 mm) urmata de incubarea acestora pe medii de cultura corespunzatoare.

Materialele

Proba de analizat: produs farmaceutic primit în stare corespunzatoare

Materiale necesare:

- agar cazeina soia, apă peptonată.
- dispozitiv filtrare prin membrana: pompă de vid; rampă cu posturi pentru filtrare, pâlnie de vid

Metoda

Pentru a obține rezultate relevante în controlul microbiologic, este necesară respectarea protocolului de lucru în laboratoarele de microbiologie și asigurarea eliminării microorganismelor străine, care

influențează negativ rezultatele. Înainte de începerea lucrului locul în care s-a desfășurat analiza a fost dezinfectat (alcool 70%).

Tipul de filtru a fost ales în așa fel încât eficiența reținerii microorganismelor să nu fie afectată de componentele probei de investigat.

Dispozitivul de filtrare, pensetele și foarfecele au fost sterilizate înainte de utilizare prin flambare (periodic și prin autoclavare).

Placile Petri au fost pregătite cu mediul de cultura adecvat: **agar cazeina soia**.

Proba de lucru s-a preparat conform protocolului primit de la LGC Standards [2].

După pregătirea probei de lucru, s-a plasat membrana de filtru pe rampa filtrantă, iar proba de analizat a fost filtrată.

În timpul procesului, microorganismele din proba de analizat au fost reținute pe suprafața filtrului prin acțiunea de selecție a membranei filtrante. Inhibitorii de creștere au fost îndepărtați prin spălarea suportului cu apă peptonată sterilă după filtrare.

După finalizarea procesului de filtrare, s-a transferat membrana filtrantă pe suprafața plăcilor Petri pregătite cu agar cazeină soia.

Plăcile astfel pregătite au fost incubate timp de 5 zile, la 30-35°C.

Rezultate și discuții

În acest studiu microbiologic s-a estimat cantitatea de microorganisme din proba furnizată de către LGC Standards [2].

Rezultatul final s-a obținut în urma numărărilor directe a coloniilor dezvoltate pe placile Petri după 5 zile de incubare, la 30 - 35°C. Rezultatul final a fost de 34 și a fost exprimat ca UFC / flacon.

Rezultatele studiilor au fost trimise la LGC Standards - Pharmasure pentru evaluare. După evaluarea datelor primite de la laboratoarele implicate în acest studiu, LGC Standards a calculat, valoarea medie, deviația standard, deviația standard relativă și scorul Z.

Datele sunt raportate de obicei folosind o valoare de *cut-off*, ca **scor Z** situat în **intervalul cuprins între - 2 și + 2**.

LGC Standards a stabilit că pentru proba supusă testării, media tuturor rezultatelor (de la 38 de laboratoare) a fost de **1,49 log 10** și deviația standard de **0,16 log 10**.

Pentru Laboratorul Control Microbiologic scorul Z a fost de **0,16 (34 UFC / flacon)** pentru numărul de microorganisme din produsul farmaceutic analizat.

Valoarea LGC Standards atribuită probelor a fost de **30 UFC / flacon** pentru numărul de microorganisme din produsul farmaceutic inclus în schema de comparare.

Concluzii

Rezultatele obținute de Laboratorul Control Microbiologic au condus la încadrarea scorului Z în intervalul stabilit de principiile statisticii (+ 0,16).

Performanța Laboratorului Control Microbiologic a fost foarte bună, în consecință, LGC Standards a transmis "*Atestatul participării la schema de teste de competență*" [3].

Bibliografie

1. Farmacopeea Europeana, Ed. 7, Ch. 2.6.12.
2. Protocol de lucru LGC Standards privind determinarea numărului de microorganisme aerobe (PTS 274).
3. Raportul LGC Standards privind determinarea numărului de microorganisme aerobe (PTS 274).



**PRODUSE ALE
INSTITUTULUI DE
CERCETARE-DEZVOLTARE
PENTRU APICULTURĂ**



VARACHET-FORTE produs medicinal de uz veterinar: se utilizează la albine pentru combaterea varrozei, parazitoză externă produsă de acarianul *Varroa destructor*.

Se administrează sub formă de fumigații prin urdiniș, iar dozarea produsului se face în funcție de tipul de stup folosit.



MAVRIROL produs medicinal de uz veterinar: se utilizează la albine pentru combaterea varrozei și braulozei, parazitoze externe produse de acarianul *Varroa destructor* și dipterul *Braulta coeca*.

Se administrează sub formă de benzi textile impregnate cu substanță activă, care se introduc în stup transversal deasupra ramelor.

SOLUȚIA EFICIENTĂ PENTRU PĂSTRAREA SĂNĂȚII FAMILIILOR DE ALBINE

Aplicații ale nanotehnologiei în biomedicină Applications of nanotechnology in biomedicine

Andreia Chirilă, Alexandru O. Doma, Romeo T. Cristina

Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

Cuvinte cheie: nanotehnologia, biomedicină, aplicații, review

Key words: nanotechnology, biomedicine, applications, review

Rezumat

Nanobiotehnologia este un câmp nou de cercetare, constituind interfața dintre științele vieții și nanotehnologie. În acest domeniu unde dimensiunile cu care se lucrează sunt cuprinse între: 1 nm și 100 nm. Acest domeniu propune exploatarea calității biomoleculilor și a proceselor pe care le implică pentru dezvoltarea unor materiale sau dispozitive cu activitate certă în medicină. Nanotehnologia terapeutică caută să ofere caracteristici specifice care pot reduce morbiditatea și mortalitatea la om și animale, dintre care cele mai importante sunt: o terapie invazivă minimală, funcții cu densitate înaltă, concentrarea în volume foarte mici. Primele origini ale noțiunii de nano-medicină provin din ideea vizionară a lui Feynman a unor nanoroboți și a unor mecanisme asemănătoare care ar putea fi proiectate, construite, și introduse în organism pentru a efectua reparații celulare la nivel molecular. Odată cu cristalizarea priorităților medicinei secolului XX și mai ales XXI, și nanomedicina a luat avânt. Prezentul review propune introducerea cititorilor în acest domeniu fascinant. Sunt prezentate informații despre nanoterapia în cancer, exemple de sisteme, aplicațiile asupra ADN-ului, separarea magnetică și manipularea celulelor și biomoleculilor, aplicațiile nanotehnologiei în ingineria țesuturilor etc. De asemenea sunt prezentate aplicațiile nanotehnologiei în ingineria țesuturilor și nano-roboții.

Abstract

Nanobiotechnology is a new field in research, constituting the interface between the life sciences and nanotechnology. In this field, the size of the working range is between 1 nm and 100 nm. This new domain it proposes the exploitation of quality biomolecules and processes involved in the development of materials or devices with definite activity in medicine. Therapeutic nanotechnology seeks to provide specific features that can reduce morbidity and mortality in humans and animals, of which the most important are: a minimal invasive therapy, high density functions and the concentration in very small volumes. The first origins of the concept of nano-medicine are from Feynman's, who had the visionary idea of the nanorobots and similar mechanisms that could be designed, constructed, and placed in the body to perform cellular repairs at the molecular level. With the priorities crystallization in the medicine domain of XX and especially of the XXI's century, also nanomedicine gained the momentum. In this respect the review proposes to introduce the reader to this fascinating field. There are provided information about cancer's nanotherapy, examples of systems, applications of DNA, magnetic separation and manipulation of cells and biomolecules, nanotechnology applications in tissue engineering and many more. Also there are presented applications of nanotechnology in tissue engineering and about nano-robots

1. Despre nanoterapia în cancer

Dimensiunile mici ale nanoparticulelor îi înzestreaază cu proprietăți care pot fi foarte folositoare în oncologie, mai ales în imagistică.

Punctele quantice (nanoparticule cu proprietăți de confinare cuantică, ca de exemplu emisia luminoasă ajustabilă după

dimensiune), utilizate în legătură cu MRI-ul, pot produce imagini excepționale ale localizării tumorale.

Aceste nanoparticule sunt mult mai luminoase decât coloranții organici și necesită doar o sursă luminoasă pentru excitare. Acest lucru înseamnă că particulele cuantice fluorescente pot produce o imagine de contrast mai bună.

O altă proprietate a acestora este suprafața mare raportată la volum, care permite atașarea multor grupări funcționale la nanoparticule, care apoi caută și se conectează la anumite celule tumorale.

Dimensiunea mică a nanoparticulelor (10 la 100nm) le permite acumularea preferențială la localizarea tumorală (pentru că tumorile nu au un sistem limfatic efectiv) [9].

Terapia anti-cancerosă fotodinamică

Se bazează pe distrucția celulelor canceroase cu ajutorul oxigenului atomic generat de laser, care este citotoxic.

Celula cancerosă preia o cantitate mai mare, față de celulele sănătoase, din colorantul special care se folosește pentru obținerea oxigenului atomic, deci doar celulele canceroase vor fi distruse (figura 1).

Din nefericire moleculele de colorant rămase migrează în piele și ochi și produc reacții de sensibilizare la expunerea solară, timp de aproape 6 săptămâni.

Pentru evitarea acestui efect secundar, varianta hidrofobică a acestui colorant este închisă într-o nanoparticulă poroasă. Colorantul rămâne în nanoparticulă, nu se împrăștie în tot organismul, dar nici nu își pierde capacitatea de a produce oxigen atomic, care va fi eliberat prin pori de 1 nm [6].

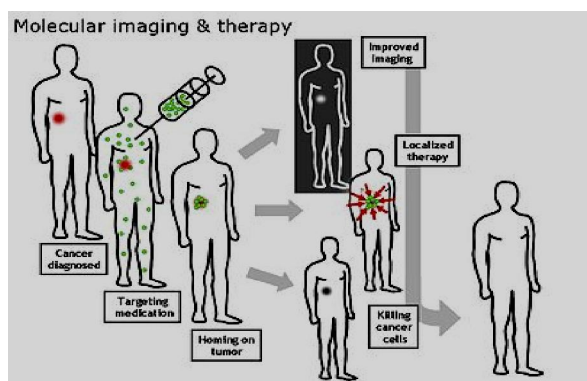


Figura 1. Utilizarea nanoparticulelor în terapia și diagnosticul imagistic al cancerului [9]

Halas și West de la Rice University din Houston au dezvoltat un sistem de

transportare a substanțelor medicamentoase denumit *nanoshell* = *nanosfere* din metal dielectric (siliciu acoperit cu aur).

Aceste nanosfere încorporate în polimeri hidrogel care conțin substanțe medicamentoase anti-tumorale, sunt injectate în organism și se acumulează lângă celulele tumorale (fig. 2).

Când sunt încălzite cu un laser infraroșu, nanosferele (puțin mai mari decât virusul poliomielitei) absorb selectiv o frecvență specifică de infraroșii, topesc polimerul și eliberează substanța activă într-un loc specific [1, 2].

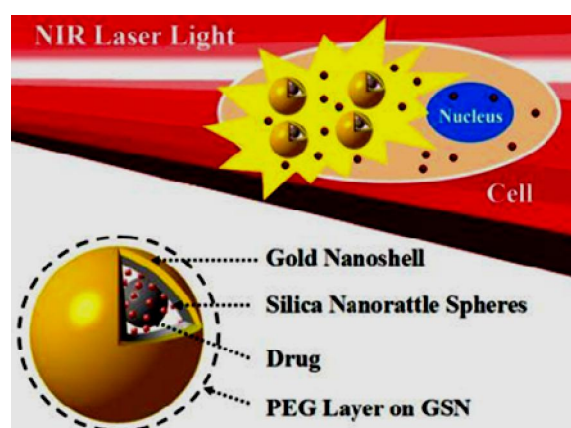


Figura 2. Nanosfere de aur [10]

Dendrimerele sunt molecule sintetice de forma stelată cu diametrul de 5-20 nanometri, formate din structuri ramificate (figura 3). Baker și Tomalia cit. Freitas, (2004) sintetizează nano-dispozitive multi - componente numite **tecto-dendrimere**.

Acestea au în mijloc un dendrimer de care se atașează alte tipuri de module dendrimerice, fiecare tip fiind proiectat pentru a îndeplini funcții necesare pentru a forma un nanodispozitiv terapeutic inteligent.

Un număr mare de combinații se pot realiza pentru a fabrica (produce) nano-dispozitivul dintr-o „bibliotecă” de componente dendrimerice, care îndeplinesc următoarele funcții:

- recunoașterea celulelor bolnave,
- diagnosticul bolilor,
- transport substanțe active,
- determinarea locației și

- **determinarea rezultatului terapiei.**

De exemplu, odată ce dendrimerele raportoare de apoptoză, intensificatoare de contrast și eliberatoarele de chemoterapeutice sunt atașate la dendrimerul central, există posibilitatea de a produce cantități mari din acest tecto-dendrimer.

Acest schelet poate fi modificat pentru a fi utilizat împotriva unui tip anumit de cancer prin substituirea dendrimerele pentru recunoaștere tumorală, creând un nano-dispozitiv „personalizat” pentru a distruge doar un anumit tip de cancer, evitând celulele sănătoase.

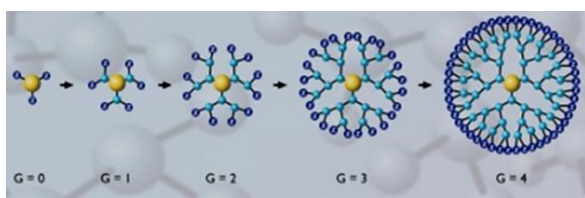


Figura 3. Exemple de dendrimere de la generația 0 la 4 [13]

La nanodispozitive sintetizate utilizând generația 5 de dendrimere din poli-amido-amidă cu centrul din etilendiamină, cu acid folic, fluoresceină și metotrexat atașat covalent la suprafața, aceștia țintesc celula tumorală, ajută în imagistică și au capacitatea de a livra intracelular substanța medicamentoasă (livrarea țintită a îmbunătățește răspunsul citotoxic al celulelor la metotrexat de 100 de ori față de cel liber).

Câteva tipuri de celule canceroase au fost asociate cu cel puțin o proteină unică pe care dendrimerele de localizare ar putea să le folosească pentru identificarea celulelor canceroase, și datorită progresiei genomice este foarte probabil să se identifice proteine unice pentru fiecare tip de tumoră.

Același tip de recunoaștere a proteinelor de suprafață ar putea fi utilizat împotriva celulelor infectate cu virusuri sau paraziți [1, 2].

Hipertermia produsă de fluide magnetice

Bazat pe faptul că particulele magnetice biocompatibile produc căldură prin diverse tipuri de pierdere energetică în timpul aplicării unui câmp magnetic AC.

Este o metodă promițătoare în terapia cancerului, datorită faptului că țesuturile se încălzesc la 42-46 °C, ceea ce reduce, în general, viabilitatea celulelor canceroase și le crește sensibilitatea la chemoterapie și radiații.

Spre deosebire de chemoterapie și radiații, hipertermia are mai puține efecte secundare. Pentru tratamentul prin hipertermie au fost utilizate diferite tipuri de nanoparticule biocompatibile magnetice, cum ar:

- fluidele magnetice stabilizate cu dextran,
- alte tipuri de fluide magnetice biocompatibile,
- nanoparticule modificate cu aminosilan,
- magnetolipozomi cationici sau
- magnetolipozomi cu afinitate [4].

Agenți de contrast

Particulele superparamagnetice sunt utilizate ca agenți de contrast în rezonanța magnetică (MRI) (figura 4).

Agenții de contrast particulați includ particule:

- foarte mici (UPSIO = *ultrasmall superparamagnetic iron oxides*) cu diametrul între 10 și 40nm;
- particule mici (SPSIO = *small superparamagnetic iron oxides*) diametrul între 60-150 nm;
- particule mari (sau orale) cu diametrul între 300nm-3,5μm.

Agenții de contrast pe bază de oxizi de fier care se găsesc în comerț sunt stabiliți de obicei cu: dextran, carboximetil dextran, carboxidextran sau copolimer de steren divinil benzen [5].

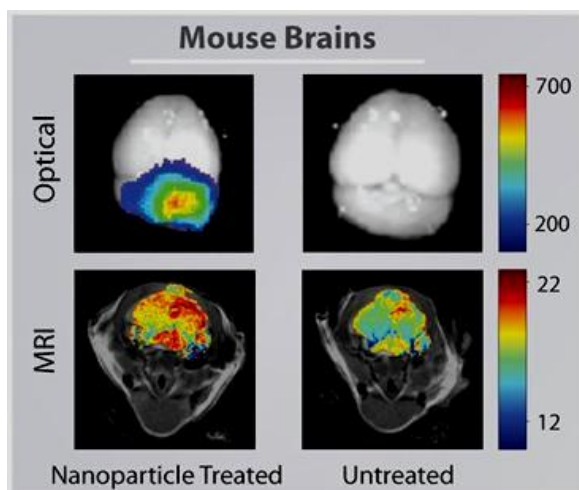


Figura 4. Creierul la șoarece utilizând ca agenți de contrast, nanoparticule (stânga) și tehnici convenționale (dreapta) [14].

Noile abordări din imagistică utilizează reporteri bioluminiscenti și fluorescenți codati genetic (etichete de identificare iluminate sau luminescente) oferind o perspectivă revelatoare asupra organismului viu, cum nu s-a mai observat înainte. Informațiile oferite de acești reporteri pot fi utilizate pentru a spori cunoștințele în biologie și dezvoltarea abordărilor terapeutice pentru boli care includ cancerul, infecțiile diverse, bolile neurovegetative și cardiovasculare.

Exemple de sisteme:

SPECT/CT

Sistem hibrid, capturează / captează atât informațiile funcționale în procesele celulare și moleculare (creștere și activitate) cât și detaliile anatomice (dimensiune și formă) a unei structuri moleculare dorite, mai rapid, eficient și mai clar decât dispozitivele imagistice standard.

Imaginile obținute prin aceste sisteme pot ajuta la identificarea rapidă a tumorilor, studierea unui tratament adecvat, livrarea unei terapii țintite pentru a distruge celulele dorite și urmărirea pentru evaluarea eficacității tratamentului.

Agenții de contrast pentru ultrasunete au fost fabricați din „microbule” care împrăștie lumina și permit clinicianului să vadă care parte a mușchiului cardiac funcționează slab.

- **NEUTROSPEC** este un agent de radiodiagnosticare care etichetează celulele albe din sânge și precursorii mieloidi fără necesitatea îndepărtării și re-injecției sângelui în pacienți.

Noul produs este, de exemplu, pentru pacienții cu semne neclare de apendicită care au vârsta de peste 5 ani.

Facilitează deasemenea vizualizarea imaginilor generate prin camera gamma, permițând medicilor să determine ușor și rapid sediul infecției [3].

Caracteristicile nanoparticulelor din fluidele magnetice (opacitate și absorbția razelor X) permit utilizarea lor în examenele radiologice. Puterea de contrast a nanoparticulelor, în cazul razelor X, este mai mare comparativ cu alte substanțe, ceea ce rezultă creșterea puterii de contrast cu până la 50% [7, 8].

2. Aplicațiile nano-tehnologiei asupra ADN-ului

Secvențierea ADN ultrarapidă

Branton și col. de la Harvard University, folosesc un câmp electric pentru a conduce o varietate de polimeri ADN și ARN prin nanoporul central al unei β -hemolizine care avea ca suport un strat bilipidic asemănător cu membrana celulară.

Branton a arătat că nanoporul poate să facă diferența între segmentele de pirimidină și purină dealungul unei molecule de ARN, iar în 2000 a demonstrat discriminarea dintre diverse lanțuri de ADN cu aceeași lungime dar cu o compoziție diferită.

Cercetările curente sunt direcționate spre fabricarea unor pori cu dimensiuni și geometrie specifică de o mare precizie, care ar putea recunoaște fragmentul de ADN dublu catenar, dar și pe cel monocatenar, care trece prin pori; și investigarea beneficiilor adăugării unor conductori electrici la nanopori pentru a îmbunătăți rezultatele. Acești nanopori ar putea permite citirea a 1000 de baze/secundă/por [2, 8].

Biomolecule radio-controlate

Jacobson a atașat antene minuscule pentru radiofrecvență pe nanocristle de aur, cu mărimea de 1,4 nm și sub 100 de atomi, care apoi au fost atașate ADN-ului.

Când se emite o radiofrecvență de aproximativ 1 GHz către antene, curenții turbionari alternativi induși în nanocristale produc încălzire inductivă foarte bine localizată, în 2 secunde producând separarea ADN-ului dublu catenar în două catene separate într-un proces de dehibridizare reversibil, care lasă moleculele vecine neatînse.

Aplicarea pe termen lung ar prevedea atașarea antenelor pe sisteme vii și controlul expresivității genelor printr-o comutare electrică de la distanță.

Nanocristalele de aur pot fi atașate deasemenea la proteine, deschizând astfel posibilitatea controlării electronice a unor procese biologice mai complexe cum ar fi plierea proteinelor și activitatea enzimatică⁽²⁾.

Tehnologia nano-ADN

Descoperirea PCR-ului (*polymerase chain reaction*) – reacție polimerizică în lanț a deschis drumul spre o nouă eră de cercetări biologice. Impactul se simte nu doar în aria biologiei moleculare, dar și în alte domenii științifice asociate.

Au fost dezvoltate noi clase de conjugate semisintetice ADN-proteină, rețele oligomerice formate din streptavidină și ADN dublu catenar, care se pot transforma în nanocercuri supramoleculare bine definite.

Conjugatele ADN-streptavidină pot fi utilizate ca blocuri modulare de construcție pentru producția unor noi reagenți imunologici pentru analiza ultrasensibilă a urmelor de proteine și a altor antigeni, prin mijloacele metodologiei imuno-PCR.

Imuno-PCR-ul este o combinație a specificității unui test imuno bazat pe anticorpi cu puterea exponențială de amplificare a PCR-ului. Prin urmare rezultă o

creștere de 1000 de ori a gradului de sensibilitate comparativ cu metoda ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*).

Conjugatele ADN-streptavidină, auto-asamblate, au fost utilizate și în nanotehnologie, conjugatele sunt utilizate ca sisteme model pentru rețelele de nanoparticule cu comutare ion dependentă; ca blocuri de construcție programate, pentru construcția rațională a biomoleculelor cu arhitectură complexă, care pot fi utilizate ca șabloane pentru dezvoltarea nanometrică a dispozitivelor anorganice.

Conjugatele covalente de ADN monocatenar și streptavidină sunt utilizate ca adaptori biomoleculari pentru imobilizarea macromoleculelor biotinate la substrat solid prin hibridizarea acidului nucleic.

Această imobilizare, ADN-dirijată, permite funcționarea selectivă și reversibilă a substratelor solide cu metalele și nanoparticulele semiconductoare, ori *viceversa*; permite funcționalizarea ADN-dirijată a nanoparticulelor de aur cu proteinele, cum ar fi imunoglobulinele și enzimele. Fabricarea nano-structurilor biometalice funcționale din nanoparticule de aur și anticorpi sunt utilizate ca instrumente de diagnostic în bioanalitică [3].

Nanobiotehnologia în analiza polimorfismului nucleotidelor unice.

Urmărind publicații ale variațiilor hărții secvențelor genomice, care conține peste 2 milioane de polimorfisme nucleice unice (SNPs), următoarea provocare ar fi dezvoltarea unei noi tehnologii care să utilizeze această informație într-o manieră cost efectivă.

Metodele de genotipare trebuie îmbunătățite pentru a crește randamentul (productivitatea), pentru a permite cercetărilor farmaceutice, biotehnologice și academice să descopere legăturile dintre unele variante genomice și boală, cu potențial consecvent pentru dezvoltarea de noi diagnostice și terapii.

Noile abordări ale extracției și amplificării ADN-ului au scurtat mult timpul necesar acestor procedee la câteva secunde. Dispozitive microfluidice permit detectarea polimorfismului prin separarea rapidă a fragmentelor utilizând electroforeza capilară și cromatografie lichidă, împreună cu amestecarea și transportul reagenților și biomoleculilor în sisteme integrate.

Obiectivele de bază în dezvoltarea sistemului de extracție și purificare care vor fi compatibile cu genotiparea SNP cu randament crescut:

- Eliberarea ADN-ului din celule în soluție fără accidentarea enzimatică sau mecanică a acestuia
- Îndepărtarea debriurilor celulare (proteine) care ar putea împiedica amplificarea sau hibridizarea ADN-ului
- Prepararea de probe de ADN economice și cu randament ridicat cu protocoale simplificate, care reduc numărul procedurilor implicate
- Evitarea chimicalelor periculoase pe cât posibil pentru a minimiza costurile cu manipularea și neutralizarea lor
- Consecvență atât în calitate cât și în cantitate a randamentului ADN-ului dintre probe astfel încât cuantificarea să nu fie necesară iar amplificarea și/sau hibridizarea ulterioară să fie de un grad înalt de reproductibilitate.

Pentru a putea stabili asociații semnificative între gene și boli ar trebui determinat un genotip de ordinul 10^7 pe zi [3].

3. Separarea magnetică

Separarea magnetică este o metodă foarte simplă, rapidă, eficientă și delicată pentru izolarea rapidă a moleculelor dorite, organelor celulare și celulelor din amestecuri biologice complexe și probe crude brute cum ar fi sângele, măduva osoasă, omogenatele tisulare, urina, fecale

sau alte materiale biologice. Separarea magnetică în eprubete este tehnologia de preferință când e nevoie de o producție ridicată de compuși puri și biologic activi și structuri biologice la scară mică

Separarea magnetică a fost folosită în principal pentru separarea imunomagnetică (IMS) a celulelor eucariote (ex. celule canceroase, celule stem, sau limfocite T).

Progresul acestei proceduri a fost activat de către dezvoltarea anticorpilor monoclonali și caracterizarea îmbunătățită a antigenilor specifici celulari. Este posibilă separarea multor tipuri de celule specifice din populații celulare mixte din sânge, măduvă osoasă și alte surse fără pierderi celulare sau deteriorări. Sunt disponibile mai multe dispozitive comerciale care permit separarea celulelor dorite dintr-un volum mare de sânge sau suspensii celulare.

- **Sistemul CliniMACS** (Miltenyi Biotec, Germania) este bazat pe MACS Technology care utilizează **MACSMicroBeads** (particule superparamagnetice de nano-dimensiuni, aproximativ 50 nm diametru, compuși dintr-o matrice de fier dextran cupalt cu anticorpi specifici) și o unitate de separare magnetică.
- CliniMacs permite separarea automată a celulelor la scară clinică într-un mediu închis și steril.
- Componentele cheie ale CliniMacs Plus Instrument sunt microcomputerul integrat, unitatea de separare magnetică, pompa peristaltică și diferitele supape.
- **Sistemul Isolex 300** este un separator magnetic de celule CD34 pozitive, ex vivo, din sânge periferic mobilizat, utilizând anticorpi monoclonali anti CD 34 și microsferă superparamagnetice. Dispozitivul constă dintr-un instrument pentru separarea Dynabeads din suspensia de celule mononucleare din sângele periferic mobilizat.

Separarea imunomagnetică (IMS), a bacterilor patogene importante (*Salmonella*, *Legionella* și *E.coli verotoxigen*) și a unor paraziți tip protozoare (*Cryptosporidium*, *Giardia*), a fost utilizată cu succes în microbiologia alimentară, medicală și chiar și a apei. Ca etichetă se folosesc atât particulele magnetice nanometrice cât și cele micrometrice cau anticorpi specifici imobilizați.

IMS permite scurtarea timpului de detecție, un caracter important din punct de vedere medical. Ca o alternativă la IMS s-au utilizat pentru scopuri similare particule magnetice cu lectine imobilizate. Particule magnetice cu anexină A₅ (V) imobilizată au fost utilizate pentru separarea simplă și eficientă a celulelor apoptotice din culturi celulare normale.

Această procedură este bazată pe faptul că anexina V este o proteină Ca²⁺ dependentă care leagă fosfolipidele, cu afinitate mare pentru fosfatidilserină (PS), care este redistribuită din interiorul membranei plasmatică spre exterior în cazul celulelor apoptotice sau moarte.

Odată ce se găsește pe suprafața celulară, PS este accesibilă pentru legarea la anexina V și cu oricare dintre conjugății ei [1, 4, 8].

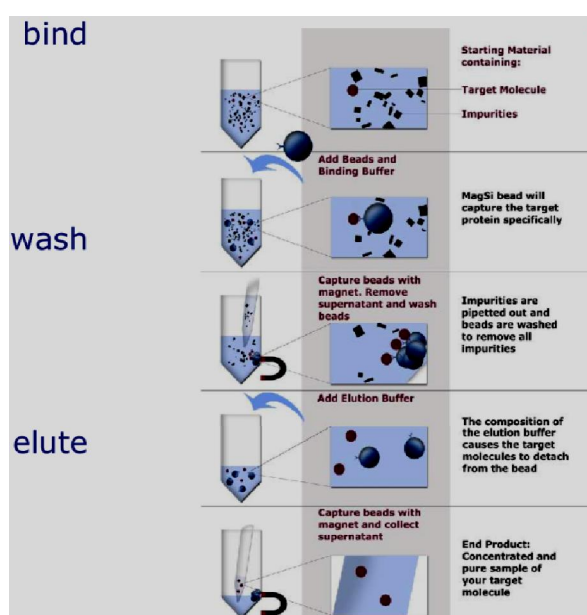


Figura 5. Separare magnetică [19]

Magnetofecția

Localizarea magnetică a acizilor nucleici legați la particule magnetice în celulele receptoare este baza „magnetofecției” care este o metodă simplă și foarte eficientă de transfecție (figura 6).

Nanoparticulele magnetice de oxid de fier sunt de obicei învelite cu molecule cationice specifice care se pot asocia cu vectori de genă (ADN, ARN antisens, ODN-oligo-deoxinucleotida, virusuri). Apoi celulele magnetice sunt concentrate pe celulele target prin influența unui câmp magnetic extern generat de magneți. Asimilarea celulară a materialului genetic este realizat prin endocitoză și pinocitoză, două procese biologice naturale. Prin urmare arhitectura și structura membrana rămân intacte, față de alte metode de tranfecție fizice, care deteriorează membrana celulară. Acizii nucleici sunt eliberați în citoplasmă prin diferite mecanisme în funcție de formularea folosită. Cuplarea nanoparticulelor magnetice cu vectorii de gene de orice fel rezultă într-o creștere dramatică a asimilării acestor vectori și prin urmare rezultă o înaltă eficiență de tranfecție. Celulele transfectate pot fi separate de cele netransfectate utilizând tehnici de separare magnetică adecvate [4].

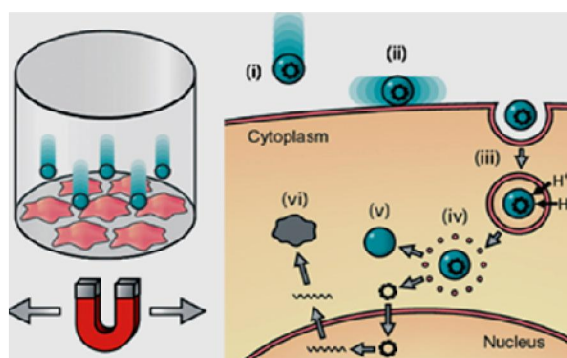


Figura 6. Magnetofecția

Nanoparticulele cu ADN și ARN antisens sunt incubate împreună cu celulele, un câmp magnetic este așezat sub suprafața plăcii în care se află culturile celulare ceea ce apropie nanoparticulele de celule (i) și le atrage dintr-o parte în alta a celulei (ii) favorizând mecanic endocitoza (iii). Odată ce complexul particulă/ADN a fost endocitat se produce ruperea endozomului (iv) și eliberarea ADN-ului (v), care apoi transcrie proteina țintită (vi) [16]

4. Manipularea celulelor și biomoleculilor

Nanoparticulele magnetizate și-au găsit multe aplicații, incluzând separarea și cercetarea celulară. Majoritatea particulelor magnetice sunt sferoidale, ceea ce a limitat în oarecare măsură posibilitățile de a le face multifuncționale. Ar putea fi fabricate nanoparticule cilindrice prin electro-depoziția metalelor într-un model nanoporos de oxid de aluminiu (III).

În funcție de model, raza cilindrului ar putea fi de la 5-500 nm cu lungimea până la 60 μm, diferiți liganzi pot fi atașați la diferite segmente; exemplu porfirine atașate cu linkeri de tiol sau carboxil au fost atașați simultan de segmente de aur, respectiv nichel. Este posibilă crearea de nanofire cu părți fluorescente izolate spațial.

S-a arătat că există posibilitatea ca un nanofir să se autoasambleze într-o suspensie, prin control magnetic extern, acest lucru ar putea permite o asamblare celulară controlată, de diferite forme [6].

Terapia prin înlocuire cromozomială

Nanoroboții ar putea interveni la nivel celular, efectuând citochirurgie in vivo. Cea mai probabilă localizare a unei funcții patologice într-o celulă este nucleul, mai specific cromozomul. Într-o procedură citochirurgicală, înlocuirea cromozomială, un nanorobot, controlat din exterior, ar putea extrage cromozomii, specifici unei anumite boli, și să îi înlocuiască cu alți cromozomi produși după tiparul original al individului, specifici celulei „operate”, dar fără gena defectă. Astfel genele defecte moștenite pot fi înlocuite, astfel putându-se trata bolile genetice [2].

Detectarea de proteine

Proteinele sunt importante în limbajul, structura și funcționarea celulară, și înțelegerea modului de funcționare a

acestora este extrem de importantă pentru progresele viitoare. Nanoparticulele de aur sunt larg utilizate în imunohistochimie, pentru identificarea interacțiunilor proteină-proteină.

Totuși capacitățile acestei tehnici sunt limitate. Spectroscopia difuză Raman este o tehnică bine pusă la punct pentru detectarea și identificarea moleculelor individuale de colorant. Prin combinarea celor două metode pe o singură nanoparticulă se pot îmbunătăți drastic capacitățile de multiplexare în examinarea proteinelor.

Prof. Mirkin a proiectat o „sondă” multifuncțională care este construită în jurul unei nanoparticule de 13 nm.

Nanoparticula este învelită în oligonucleotide hidrofilice care conțin colorant Raman la un capăt și sunt terminate cu un element de recunoaștere (biotina). Această moleculă este catalitic activă și va fi învelită în soluție de argint și hidrochinonă.

Soluția de argint și hidrochinonă reacționează cu substratul, și se produce legarea sondei la molecule și o placare cu argint aproape de colorantul Raman, care permite detectarea la un microscop Raman standard. În afară de faptul că această sondă este capabilă să recunoască molecule mici, ea poate fi modificată să conțină anticorpi la suprafața pentru recunoașterea proteinelor. Sonda nu prezintă reactivitate încrucișată în determinarea proteinelor și a moleculelor de dimensiuni mici [6].

Nanofiltrele cu barieră (*gated nanosieves*)

Debitul substanțelor prin nanopori poate fi controlat și extern. Prima sită nano cu porți voltaj dependente a fost fabricată de Nishizawa și col. în anul 1995 la Colorado State University, avea o matrice de nanotubi din aur cu diametrul intern de 1,6 nm.

Când nanotubii sunt încărcăți pozitiv, se permite doar transportul ionilor negativi, cei pozitivi fiind excluși; cu un voltaj negativ vor fi transportați doar ionii pozitivi. Nanodispozitive similare combină acum

porțile voltaj dependente cu dimensiunea porilor, forma și tipul de încărcare pentru a obține un control precis al ionilor transportați cu semnificativă specificitate moleculară (figura 7).

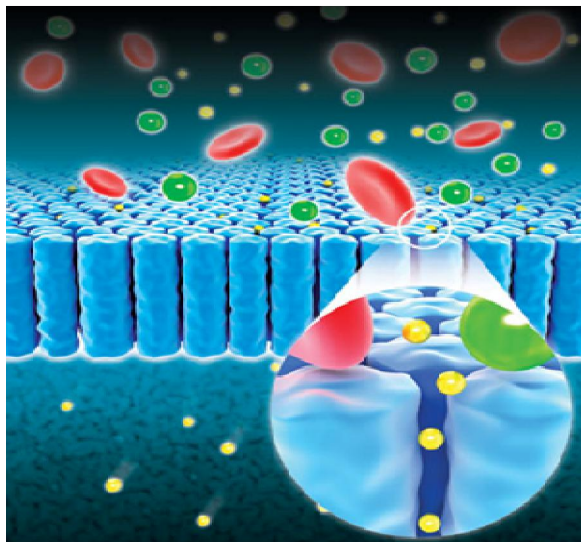


Figura 7. Nanofiltru [17]

Eforturile recente ale lui Martin și Kohli au fost direcționate spre imobilizarea unor molecule biochimice, agenți de recunoaștere, cum ar fi enzime, anticorpi, alte proteine și ADN, înăuntrul nanotuburilor pentru fabricarea unor nanosenzori biologic activi, pentru separarea substanțelor active sau pentru biocataliza selectivă [2].

Imunoizolarea unor celule față de organism

Unul din cele mai simple nanomateriale este reprezentat de o suprafață cu găuri, nanopori.

În 1997 Desai și col. au creat ceea ce s-ar putea considera unul din primele dispozitive terapeutice nanomedicale, utilizând microprelucrarea în "vrac", pentru a fabrica "camere" minuscule în interiorul unor casete din silicon cristalin, în care se pot așeza celule.

Camerele interferează (comunică) cu mediul biologic înconjurător printr-o membrană filtrantă din silicon policristalin, cu nanopori simetrici de aproximativ 20nm.

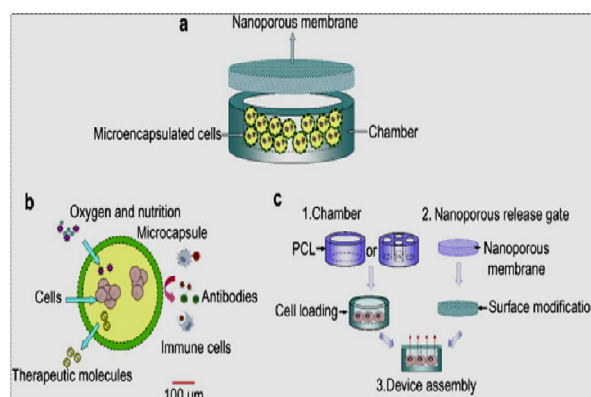


Figura 8. Diagrama unor membrane biodegradabile nanoporoase; a-dispozitiv integrat; b- microcapsule; c- capsule PCL cu porți nanoporoase [20].

Acești pori sunt destul de mari pentru a permite trecere moleculelor mici ca oxigenul, glucoza și insulina, dar sunt destul de mici pentru a împiedica pasarea moleculelor mai mari din sistemul imun ca imunoglobulinele și particule virale.

În spatele acestei bariere artificiale, celulele pancreatice, de șobolan, încapsulate și imunoizolate primesc nutrienți și rămân sănătoase timp de mai multe săptămâni, secretă insulină prin pori, în timp ce rămân ascunse față de sistemul imun, care în mod normal le-ar ataca și ar respinge celulele străine.

Microcapsule cu celule insulare pancreatice de porc ar putea fi implantate subcutan la pacienții bolnavi de diabet, restaurând temporal feedback-ul glucozei în organism, în timp ce se evită folosirea unor imunosupresante puternice, care ar putea duce la riscuri crescute de infecții.

Furnizarea unor celule encapsulate organismului ar putea fi de valoare în tratarea altor boli cu insuficiență hormonală sau enzimală.

Pe viitor se i-a în considerare folosirea unor neuroni încapsulați care ar putea fi implantați în creier și apoi stimulați electric pentru eliberare de neurotransmițători și folosirea acestora în tratamentul bolii Alzheimer sau Parkinson.

Desai a activat în studierea imunoizolării, transportului de medicamente și senzori pe bază de celule [2].

Farmaceutice bazate pe fulerene

Derivate solubile ale fulerenelor cum ar C_{60} (un aranjament din 60 atomi de carbon pe moleculă de forma unei mingi de fotbal) prezintă mari promisiuni ca agenți farmaceutici.

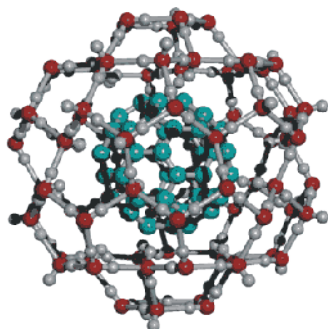


Figura 9. Fulerenă $C_{60}(H_{20})_{80}$ ⁽¹⁵⁾

Acești compuși, care sunt deja tema unor studii clinice, au o biocompatibilitate bună și toxicitate relativ scăzută chiar și la doze relativ mari.

Fulerenele pot fi utilizate ca și compuși antivirali (mai ales împotriva HIV), agenți antibacterieni (*E. coli*, *Streptococcus spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*), agenți terapeutici fotodinamici antitumorali și anticancer, ca agenți antioxidanți și antiapoptotici în terapia sclerozei laterale amiotrofice și bolii Parkinson [1, 2].

Acțiunea asupra trombilor vasculari

Sonolysis – microbule cu gaz pentru aplicații terapeutice.

Pentru dizolvarea trombilor vasculari, microbulele sunt administrate intravenos sau injectate local într-o structură vasculară specifică, cum ar fi o grefă vasculară.

Ultrasunetul va fi aplicat extern (sau printr-un cateter intern) deasupra zonei cu coagulului pentru a asigura acțiune țintită localizată. Microbulele perfuzează coagulul, și acționează ca dispozitive micro-mecanice; prin ultrasunete se sparg bulele

din câmpul de acțiune, ceea ce duce la dezintegrarea coagulului.

Nanochirurgia "sonolysis" (sonolizare) reprezintă o terapie nanoinvazivă localizată pentru tratamentul trombozei vasculare (figura 10).

Comparat cu terapiile alternative pentru tromboză, sonoliza are meritul de a fi mai puțin invazivă decât trombectomia mecanică și mai rapidă decât terapia medicamentoasă convențională, cu mai puțin risc de sângerare [3].

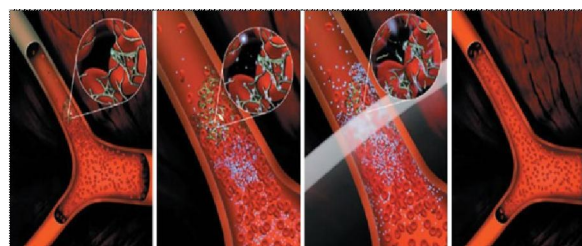


Figura 10. Tehnica Sonolysis [11].

5. Ingineria țesuturilor

Suprafața osoasă nu este netedă, ea prezintă denivelări (rugozități) care pot ajunge până la 100 nm dimensiune.

Dacă suprafața implantului osos artificial ar fi netedă, organismul l-ar respinge, ar exista posibilitatea ca implantul să fie acoperit de un strat de țesut fibros, lucru care reduce contactul dintre implant și os, care duce la slăbirea implantului și produce inflamație.

A fost demonstrat că prin crearea unor rugozități de dimensiuni nanometrice, pe protezele de șold, genunchi, se poate reduce rata respingerii și se stimulează producția de osteoblaste.

Osteoblastele sunt celule responsabile de creșterea matricei osoase. Efectul a fost demonstrat cu materiale polimerice, ceramice dar mai recent și pe metal.

Mai mult de 90% dintr-o suspensie de celule osoase au aderat la nanostructurile de pe suprafața metalică.

În final aceste constatări vor ajunge la proiectarea unor proteze mai durabile (rezistente), și reduc șansele ca implantul să slăbească. S-a arătat că utilizând abordarea

biomimetică, creșterea înceată a unui film nanostructurat de apatită din lichidele corporale stimulate, a rezultat formarea unui strat nanoporos puternic aderent.

Startul a fost construit din 60 nm de cristale, și posedă o structură nanoporoasă stabilă și bioactivitate [6, 8].

Aplicațiile nanotehnologiei în ingineria țesuturilor

Prin ingineria țesuturilor se referă la dezvoltare de noi țesuturi in vitro, care mai apoi vor fi plasați chirurgical în corp, sau stimularea refacerii in situ utilizând implante bioartificiale din celule vii, introduse aproape de locul vătămat [3].

Un aspect crucial în transplantul celular este urmărirea și monitorizarea grefelor celulare în beneficiarul transplatului.

Pentru a verifica celulele *in vivo* au fost utilizate nanoparticule superparamagnetice de oxid de fier pentru etichetare celulară, permițând vizualizarea ulterioară *in vivo* pe MRI. MRI-ul este o metodă neinvazivă care se poate utiliza nu doar pentru a se confirma că celulele s-au grefat, dar poate monitoriza și timpul scurs în migrația celulară și supraviețuirea acestora în țesutul dorit.

Aceste informații ajută la optimizarea procesului de transplant în ceea ce privește numărul de celule necesare, metoda, sau locul administrării celulelor și fereastra terapeutică eficientă în ceea ce privește timpul scurs din momentul lezionării și eficacitatea transplantului [4].

Se folosește materie (material) de la același individ, pacient (autolog), sau de la alți indivizi (alogenici), sau chiar de la alte specii de mamifere (xenogenic).

S-a luat în vedere, prin implicarea microelectronicii sau nanotehnologiei, crearea de țesuturi sau organe bioartificiale care pot lua locul unui organ care este bolnav terminal (ochi, ureche, inimă sau articulație). Dispozitivele protetice implantabile și nanoschelele pentru dezvoltarea (creșterea) noilor organe sunt

noile scopuri (ținte) ale cercetătorilor în nanotehnologie. Un avans rezonabil s-a făcut în nanoingineria hidroxiapatitei pentru înlocuirea osoasă.

Pe viitor, ne putem imagina o lume unde nanodispozitivele sunt implantate în mod curent sau chiar injectate în circulația sanguină pentru a monitoriza starea de sănătate și a participa automat la repararea sistemelor care au deviat de la normal.

Acești nanoroboți ar putea fi personalizați prin adaptarea lor la genotipul și fenotipul pacientului pentru a optimiza intervenția în stadiile inițiale ale bolii exprimate [3, 7].

„Creșterea” de noi organe

Construirea de celule la scară nanometrică poate fi realizabilă prin replicarea lor programată.

Semnalele sunt transmise, înainte și înapoi cu instrucțiile, pentru dimensiunea și forma dorită, la locul construcției.

Când instrucțiunile complete sunt terminate, organele pot fi "crescute" conform condițiilor specificate.

Pentru a fi compatibile cu statutul imunologic al individului aceste organe ar putea avea codat ADN-ul necesar. Acest lucru ar putea spori (ușura) integrarea structurilor artificiale cu țesuturile vii, împrumutând interfața adecvată sistemelor biologice, având avantajul absenței reacției imune, față de organele donor care se utilizează.

În anii următori asta ar putea reprezenta un salt major în managementul tulburărilor prin insuficiență de organ [3].

6. Determinările biologice

Coduri optice multicolore pentru determinări biologice

Creșterea numărului de cercetări în genomică și proteomică generează un număr crescut de secvențe de date și

necesită dezvoltarea unei înalte tehnologii de screening.

Multe tehnologii de determinare ajung la saturație când numărul elementelor ajunge la câteva milioane.

O abordare tridimensională, bazată pe „coduri de bare optice” din particule de polimeri în soluție; este limitat doar prin numărul redus de „tag”-uri (etichete) unice pe care le poate produce și detecta.

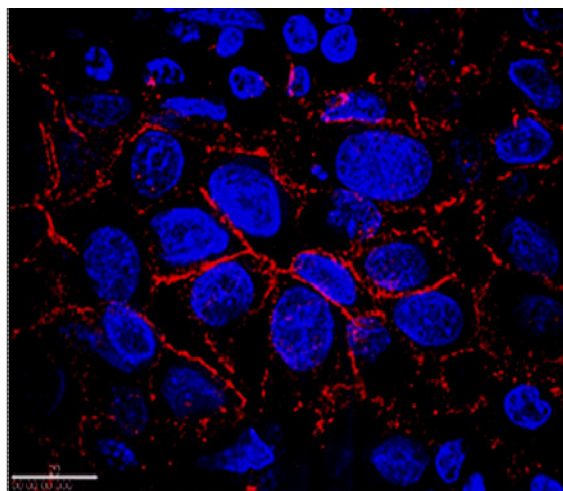


Figura 11. Celule cancer mamar cu membrana celulară roșie datorită reacției punctelor cuantice, și nuclei colorați în albastru [18]

Punctele cuantice (quantum dots) singulare au fost utilizate cu succes ca un înlocuitor al coloranților organici în diverse aplicații de bio-tagging.

Această idee a fost dusă mai departe prin combinarea a diferite puncte cuantice de diverse mărimi, care au diferite culori fluorescente, combinându-le în microsferice polimerice. Selecția nanoparticulelor utilizate în acest experiment are 6 culori diferite de 10 intensități, și este de ajuns pentru a coda 1 milion de combinații [6].

Nanotehnologia în măsurarea oxigenului dizolvat

Oxigenul este unul din metaboliții majori în sistemul aerobic, iar măsurarea oxigenului dizolvat este de importanță majoră în aplicații din medicină, industrie și mediu.

Interesele recente în metode de măsurare a concentrației oxigenului dizolvat s-au așezat mai ales asupra senzorilor optici, datorită avantajelor pe care le au față de electrozii ampermetrii convenționali [3].

Nanosenzorii optici PEBBLE (probes encapsulated by biologically localized embedding) sunt sonde încapsulate prin încorporare biologic localizată – au fost proiectați pentru oxigenul dizolvat utilizând silicați modificați organic (ormosil) ca matrice pentru nanoparticule.

Nanoparticulele de ormosil sunt formate dintr-o particulă centrală cu feniltrimetoxisilam ca precursor urmat de formarea stratului de înveliș cu metiltrimetoxisilam ca precursor.

Structura foarte permeabilă și natura hidrofobică a nanoparticulelor de ormosil, precum și dimensiunea lor mică, rezultă un răspuns de fluorescență la oxigenul dizolvat și un răspuns liniar în toată seria de la concentrația 0% până la cea de 100 % oxigen [3].

Nanoparticulele ca biomarkeri

Nanoparticulele pot fi utilizate atât pentru detecția cantitativă cât și calitativă a celulelor tumorale in vitro.

Sporesc procesul de detectare prin concentrarea și protejarea markerilor împotriva degradării, în scopul de a face analiza mai sensibilă.

De exemplu nanosferele de polistiren fluorescent învelit în streptavidină,

Fluorospheres- fluorescență verde și **TransFluorospheres - fluorescență roșie**, au fost utilizate pentru detectarea receptorului factorului de creștere epidermală (EGFR) pe celule A431 (celule de carcinom epidermoid uman) prin metoda citometriei de flux cu o singură culoare.

Rezultatele au arătat că nanosferele fluorescente asigură o sensibilitate de 25 ori mai mare decât conjugatele streptavidină-fluoresceină.

În studierea biomarkerilor este dezvoltarea unora care detectează timpuriu, cu succes și mai bine bolile curabile.

Agenții de contrast pot fi încărcăți în nanoparticule pentru diagnosticul tumorilor.

Caracteristicile fizico-chimice ale nanoparticulei (dimensiunea, polarizarea suprafeței, învelișul suprafeței, stabilitatea) permit redirectionarea și concentrarea markerilor la locul de interes.

Particule coloidale etichetate pot fi utilizate ca agenți de radiodiagnostic.

Pe de altă parte, niște sisteme coloidale ne-etichetate sunt deja utilizate sau testate ca agenți de contrast în metode de diagnostic CT și RMN.

Pe viitor, nanoparticulele cu afinități specifice de legare ar putea fi resuspendate în fluide corporale recoltate, sau poate chiar injectate direct în circulația sanguină.

Nanoparticulele împreună cu moleculele legate, ar putea fi capturate direct prin filtre și studiate prin spectrometrie cu rezoluție înaltă [3, 7].

Detectorii de virus

Grupul lui Lieber a reușit detectarea electrică directă, cu selectivitate ridicată, a particulelor virale.

Acestia au utilizat tranzistori cu câmp pentru a măsura modificările minore de conductanță caracteristice legării și defacerii pe matricea de nanofire modificată cu anticorpi virali. Matricile detectează virusuri atât din fluide corporale cât și din alte fluide.

Grupul a testat matrici cu receptori specifici pentru Virusul Influenzei tip A, paramixovirusuri și adenovirusuri, și au constatat că detectorii pot diferenția între aceste 3 virusuri, datorită faptului că s-au utilizat receptori specifici pentru fiecare în parte, și pentru că fiecare virus se leagă pentru o anumită perioadă de timp la receptor; astfel șansele unui rezultat fals pozitiv sunt minime [2].

7. Roboții biologici

„Bioroboții” bacterieni pot fi construiți de exemplu din aprox 300 de gene bine păstrate (aproximativ 150000 baze) ceea ce constituie genomul minim pentru un microtub funcțional.

Utilizați în medicină, acești microtubi, ar putea fi proiectați să producă selectiv vitamine, hormoni, enzime și citochine în organismul deficitar, sau să absoarbă și să metabolizeze selectiv în produși finali, inofensivi, substanțe dăunătoare, otrăvuri, toxine sau detritusuri intracelulare nedigerabile. Egea Biosences este proprietara unei tehnologii de scrierea a genelor și programarea proteinelor (GeneWriter and Protein Programming) cu o bază de date de peste 1 milion de proteine programate, produce peste 200 de gene sintetice și proteine, și a reușit sinteza celei mai mari gene sintetizate chimic (peste 16000 de baze).

Cercetătorii de la Institute of Biological Energy Alternatives, îndepărtează materialul genetic din microorganisme (*Mycoplasma genitalium*), sintetizează un lanț de material genetic asemănător cu cel natural și speră ca lanțul artificial să conțină un număr minim de gene de *M. Genitalium* pentru a susține viața. Cromozomul artificial va fi introdus în celula ”golită” care va fi apoi testată pentru abilitatea de a supraviețui și a se reproduce. Pentru a asigura siguranța, celula va fi incapabilă să producă infecții, și va fi limitat și conceput în așa fel încât să moară dacă ajunge în mediu [2].

Nanoroboții medicali de mână

Pe termen mai lung, poate în 10-20 de ani, sistemul de mașini moleculare și nanoroboți ar putea fi folosit de medici în lupta contra bolilor, în sănătate și îmbătrânire. Materialele de construcție organice (proteinele) sunt foarte bune la autoasamblare, dar cele mai performante dispozitive moleculare pot fi construite din materiale „diamantoide”, cea mai puternică

substanță, dar proiectul nanoroboților din aceste materiale rămâne controversat [2, 3].

Respirocitele

Un exemplu al unui nanorobot este celula roșie (eritrocitul) artificială mecanică sau „respirocitul”, un dispozitiv sferic de 1 μm dimensiune, cu sistem de pompare activ prin glucoză serică endogenă, capabil să transporte de 236 de ori mai mult O_2 decât eritrocitul natural.

Nanorobotul este format din 18 miliarde de atomi aranjați cu precizie și „umpluți” cu până la 3 miliarde molecule de O_2 și CO_2 . Mai târziu gazele se eliberează din dispozitiv prin pompe moleculare.

Respirocitele imită acțiunea eritrocitului, senzorii de concentrație a gazelor aflate la exteriorul fiecărui dispozitiv reacționează, astfel nanorobotul știe când trebuie să se încarce cu O_2 și când să descarce CO_2 în plămâni (figura 12).

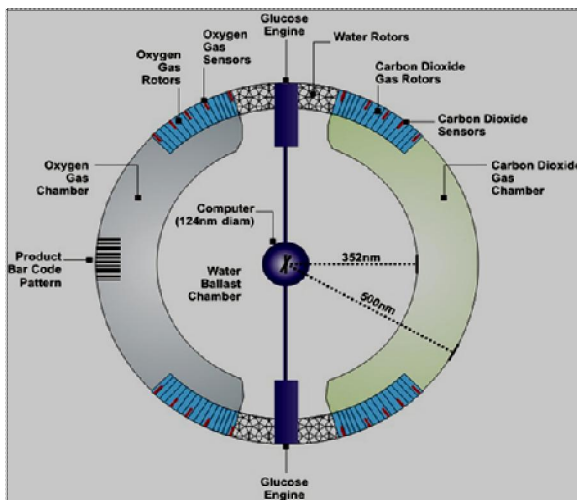


Figura 12. Schema prototipului unui respirocit [12]

Un nano computer și numeroși senzori chimici și de presiune ajută dispozitivul să funcționeze corespunzător și să poată fi ajustat din exterior.

Injectarea a 5 ml, doză terapeutică, de respirocite 50% în soluție salină, adică 5 trilioane de nanoroboți, în circulația sanguină, ar dubla capacitatea

de transport a oxigenului (studii efectuate la un volum de aproximativ 5,4 l sânge).

Aplicații ale respirocitelor: substituenți în transfuzii, tratament în anemie, disfuncții pulmonare, perinatale și neonatale, terapie și diagnostic în cancer, prevenirea asfixiei, respirație artificială [2, 3].

Microbivori

O celulă albă (leucocit) mecanică de dimensiuni microscopice, care are ca funcție distrugerea patogenilor din circulația sanguină, utilizând digestia și eliminarea. Prototipul are formă sferoidală turtită, cu axul mare cu diametrul de 3,4 μm , și axul mică cu diametrul de 2,0 μm .

Microorganismul țintit se va lega la suprafața dispozitivului datorită locașurilor speciale de legare specifice de specie, după care niște cârlige telescopice stabilesc ancorarea acestuia și introducerea lui în interiorul dispozitivului. Inițial patogenul va fi mărit într-o cameră de 2 μm^3 , apoi va fi transferat într-o altă încăpere cu dimensiuni similare unde va fi supus digestiei enzimaticе, cu ajutorul a 40 de enzime sintetice. În urma digestiei enzimaticе vor rezulta produși ca aminoacizi, mononucleotide, glicerol, acizi grași liberi și zaharuri simple.

Aceste molecule inofensive, sunt eliminate în torentul sanguin, tot procesul având durata de 30 de secunde. Acești nanoroboți pot fi de 80 de ori mai activi ca agenți fagocitanți decât macrofagele, și ar avea o durată de viață mult mai lungă.

O doză de câțiva ml de microbivori ar elimina în totalitate o infecție septicemică în câteva minute la câteva ore, după care microbivori ar fi eliminați complet, din corp [2].

Explorarea comercială

Majoritatea companiilor se axează pe dezvoltarea de aplicații farmaceutice, cum ar fi transportul de substanțe medicamentoase. Mai multe companii exploatează efectele dimensiunii cuantice a nanocristalelor semiconductoare pentru etichetarea biomoleculilor, sau utilizarea

nanoparticulelor de aur bio-conjugate pentru etichetarea diferitelor componente celulare. Alte companii aplică materiale nano-ceramice în ingineria țesuturilor și ortopedie. Argintul coloidal este larg utilizat ca formulare antimicrobială, reactivitatea mare a oxidului de titan, poate fi utilizat ca atare sau după ce a fost iluminat cu raze UV ca bactericid (tabelul 1 și figurile 13 și 14).

Tabelul 1

Exemple de nanomateriale comercializate pentru aplicații bio-medicale (după Salata O.V., 2004) [6].

Transportul de substanțe medicamentoase	Nanoparticule polimerice pentru transportul medicației antitumorale care poate traversa bariera hemato encefalică Reducerea dimensiunii particulelor la 50-100 nm Nanoparticule micelare pentru încapsularea substanțelor medicamentoase, proteinelor, ADN-ului
Filtrare prin membrană	Materiale ceramice nanoporoase pentru filtrarea endotoxinelor, separarea ADN-ului și a proteinelor.
Pastă de dinți	Nanoparticulele de hidroxiapatită par să îmbunătățească suprafața dintelui
Dezinfectante de suprafață	Nanoemulsii
Biomarkeri luminescenți	Puncte cuantice semiconductoare cu grupări amino sau carboxil la suprafață, emit între 350-2500 nm (lungime de undă)
Detectarea și separarea pe tipuri de celule	Miez magnetic înconjurat de un strat polimeric cu anticorpi pentru capturarea celulelor.
Filtre AiroCide	Oxitul de titan distruge patogenii din aer.
Nanoparticule de aur pentru bioanaliză	Nanoparticule de aur bio-conjugate pentru TEM sau microscopie fluorescentă.
Biomarkeri din aur	Coduri de bare de ADN atașate la nanosinde pentru identificare, PCR-ul este utilizat pentru amplificarea semnalului
Bariere solare	Nanoparticule transparente pentru absorbția razelor UV, și transformarea în căldură
Bandaje Acticoat	Argintul în formă de nanocristale foarte activ asupra patogenilor
Ingineria țesuturilor	Implante ortopedice și dentale, exploatarea proprietăților materiale a siliconului nanoporos



Figura 13. Bandaje Acticoat [21].

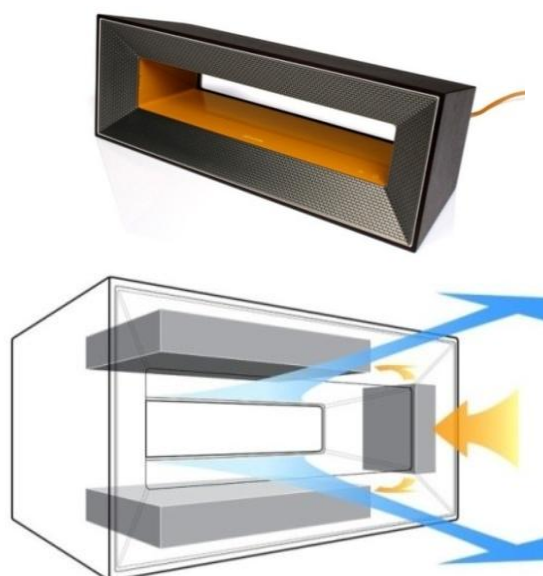


Figura 14. Filtrul de aer Airocid [22]

Viitorul nano-biotehnologiei

În forma actuală, majoritatea nanoparticulelor comerciale, cu aplicații în medicină, duc către transportul de substanțe medicamentoase. În bioștiință, nanoparticulele înlocuiesc coloranții organici în aplicații care necesită fotostabilitate ridicată și deasemenea capacități mari de multiplexare.

Sunt evoluții în direcționarea și controlarea nanoparticulelor, cum ar fi conducerea nanoparticulelor magnetice către tumori, apoi ori eliberează substanța medicamentoasă ori doar produce hipertermie localizată, distrugând țesuturile din jur.

Tendența majoră în dezvoltările viitoare a nanomaterialelor este să le facă multifuncționale și controlabile la semnale exterioare sau de mediul local, astfel transformându-le în nanodispozitive [6].

Bibliografie

1. **Cristina Romeo T.** (2009). Noutăți în nanomedicină, <http://www.veterinarypharmacology.com/docs/585-NANOMEDICINA.pdf>, 2009
2. **Freitas RA Jr.** (2004). What is nanomedicine. 1(1) 2-9
3. **Ernest H, Shetty R** (2005). Impact of Nanotechnology on Biomedical Sciences: Review of Current Concepts on Convergences of Nanotechnology with Biology
4. **Safaric I, Hiska K, Safarikova M** (2011). Magnetic Nanoparticles for Biomedicine, in: Intracellular delivery: Fundamentals and Applications, Fundamental Biomedical Technologies, Ed. Prokop. Springer Bv, , 363-372
5. **Safaric I, Safarikova M** (2009). Magnetic nanobiocomposites and their possible applications, NanoCon 2009, Rožnov pod Radhoštěm, Česká Republika
6. **Salata O.V.** – Applications of nanoparticles in biology and medicine, Journal of Nanobiotechnology, 2 (3), 2004
7. **Șincăi M, Vulpe AI** (2003). Observații asupra efectului protector al unor nanocompuși magnetici asupra pielii în condiții de expunere prelungită la UVR, Lucrare de diplomă
8. **Șincăi M, Lupescu RC** (2007). Efectul UV protector al unor compuși cu nanoparticule, Lucrare de diplomă, 2007
9. Nanomedicine – Wikipedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Nanomedicine>, 2013
10. http://english.cas.cn/Ne/CASE/201101/t20110121_64693.shtml
11. <http://rehabilitacionymedicinafisica.files.wordpress.com/2009/02/sonolysis2.jpg>
12. <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3034>
13. <http://www.chemheritage.org/discover/online-resources/chemistry-in-history/themes/microelectronics-and-nanotechnology/tomalia.aspx>
14. <http://www.futurity.org/health-medicine/nano-painting-lights-up-brain-tumors/>
15. <http://www.lsbu.ac.uk/water/buckmin.html>
16. <http://www.nano-reviews.net/index.php/nano/rt/printerFriendly/5167/5775>
17. <http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=26485.php>
18. <http://www.nist.gov/mml/bmd/her2-021908.cfm>
19. <http://www.nordicdiagnostica.com/magnetic-beads/2284>
20. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961208005115>
21. <http://www.woundsource.com/product/actico-at-7>
22. <https://www.airocide.com/how-it-works>

Ghid de diagnostic în hipertiroidismul felin Diagnostic guide methods in the feline hyperthyroidism

Andreea Pap*, Florin Simiz, Andreia Chirila, Romeo T. Cristina

Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

*Autor corespondent: pap.andreea@ymail.com

Cuvinte cheie: *glanda tiroidă, endocrinopatie, tiroxina T₄, triiodtironina T₃, TRH, iod radioactiv, scintigrafie*
Keywords: *thyroid gland, endocrinopathy, tyroxine, triiodtironine, TRH, radioiodine scintigraphy*

Rezumat

Ținând cont de etiologia multifactorială a acestei endocrinopatii, confirmarea diagnosticului de hipertiroidism a întâmpinat numeroase dificultăți de-alungul anilor nu numai datorită necesității unor cunoștințe medicale cât și a lipsei posibilității de a realiza diferite examene de laborator mai mult sau mai puțin accesibile. Astfel că în prezent metodele cele mai frecvent utilizate și accesibile sunt dozarea hormonilor tiroidieni totali sau liberi, testul de supresie cu triiodtironină, iar una dintre metodele ce necesită aparatură specială însă nu este accesibilă și în țara noastră este scintigrafia.

Introducere

Hipertiroidismul, este endocrinopatia considerată numărul unu în ceea ce privește afecțiunile sistemului endocrin întâlnite la pisică este o afecțiune multisistemică ce se caracterizează printr-o producție și secreție exagerată de hormoni tiroidieni activi la nivelul glandei tiroide.

Aceasta este localizată în regiunea cervical ventrală, la nivelul gâtului, inferior de laringe și cartilajul cricoidian în contact cu primele inele traheale.

Din punct de vedere macroscopic este formată din 2 lobi, uniți între ei print-run istm dar spre deosebire de alte specii, la pisică este absent [10, 15].

Ea afectează îndeosebi, pisicile cu vârsta cuprinsă între 4 și 16 ani afectând cu predilecție pisicile cu o vârstă medie de 10 ani și se poate traduce morfopatologic în hiperplazie adenomatoasă, ce apare în proporție de 98-99% dar și în carcinom tiroidian prezent în mai puțin de 1-2% din cazuri.

Până acum nu se știe cu certitudine dacă această afecțiune are predispoziție de sex sau de rasă, dar unii autori atestă faptul

că pisicile din rasa Siameză, Himalayană și metișii lor sunt mai rar diagnosticate cu hipertiroidism decât celelalte rase [9,13,15].

Etiopatologia acestei afecțiuni este plurifactorială și destul de complexă, iar unii autori susțin că administrarea dietei umede sub formă de conserve joacă un rol important în apariția acestei afecțiuni, în special datorită conținutului crescut al acestora în iod, factori goitrogeni, soia, polifenoli și resorcinol. Unele studii sugerează

că pe lângă factorii nutriționali un rol important îl joacă și factorii de mediu, precum:

- utilizarea litierei
- dormitul frecvent pe podea
- consumul de apă murdară
- parazitismul cu purici
- prezența eterului difenil polibrominat din electrocasnice și electronice
- conviețuirea exclusivă în casă
- tratarea așternutului cu substanțe antiparazitare
- fertilizanți, erbicide, etc.

Toți acești factori prezenți în viața de zi cu zi atât a omului cât și a pisicilor nu fac

decât să favorizeze apariția sau înrăutățirea stării clinice a pacientului făcând astfel dificilă depistarea factorilor etiologici și înlăturarea acestora [15, 17].

Ținând cont de etiologia plurifactorială a acestei afecțiuni precum și de gradul de dificultatea a confirmării unui diagnostic, pentru evaluarea funcției glandei tiroidiene la pisicile suspecte de hipertiroidism, au fost propuse de-a lungul anilor numeroase proceduri a căror rezultate ne pot îndrepta spre confirmarea sau eliminarea diagnosticului, precum și gradul de implicare a cordului sau prezența unor afecțiuni concurente. Printre acestea se numără examenul clinic, diagnosticul de imagine, electrocardiografia și testele de laborator.

Examenul clinic

De cele mai multe ori, semnele clinice ale pisicilor aduse la cabinet pentru consultație, sunt într-un stadiu de boală incipient spre moderat, datorită faptului că proprietarii acestora nu observă anumite modificări, (de exemplu slăbirea, în ciuda unui apetit normal sau crescut).

Lipsa sesizării este rezultatul conviețuirii zilnice cu acestea, astfel că pierderea în greutate a pisicilor vor fi observate de persoanele ce vizitează proprietarii, după o anumită perioadă de timp.

Proprietarii mai pot observa și modificări comportamentale, reprezentate de hiperactivitate, neliniște, chiar agresivitate față de stăpâni sau alte animale din același mediu. Foarte rar (10%) se poate observa o stare de apatie sau de nepăsare față de activitățile din jur, depresie, inapetență și slăbiciune, caracteristică unei forme de hipertiroidism aparte numită hipertiroidismul apatic. Se mai pot observa modificări ale tractului gastro-intestinal traduse printr-o frecvență crescută a vomitării și a diareei, precum și creșterea cantității de fecale, datorită polifagiei. Vor apare modificări și la nivelul blănii, părul având un aspect murdar și aspru [4, 5, 17].



Figura 1. Aspectul murdar al părului la o pisică cu hipertiroidism (original, Pap)

La examinarea fizică a pisicilor suspecte de hipertiroidism sunt utilizate procedeele standard ce cuprind inspecția, palpația și ascultația.

La **inspecția regiunii cervicale ventrale**, se poate observa uneori o mărire a acesteia, ceea ce coincide, de obicei, cu creșterea glandei tiroide, așa numita gușă.

Atunci când se suspectează prezența unei mase, se recomandă palparea regiunii cervicale. Iar pentru realizarea acestei manopere, pisica trebuie poziționată în șezut, cu gâtul în extensie, cu bărbia ridicată la un unghi de 45° și întoarsă spre partea opusă celei palpatate [12, 14, 18].

Fie rămâne în poziție staționară, clinicianul plasându-se în spatele acesteia, unde cu o mână ține capul pisicii, într-o parte și în sus, la un unghi de 45° [14].

Palparea propriu-zisă se realizează prin glisarea degetelor în jghebul dintre trahee și mușchiul sternoidian (figura 2), de la laringe spre manubriul sternal.

Glisarea se face pe fiecare parte individual [12, 14, 18].

În timpul realizării acestei examinări, este foarte important să se evite hiperextensia gâtului, pentru ca lobiile tiroidiene să nu se încorporeze în mușchi sau să nu fie derivați retrotraheal făcând astfel dificilă palparea sau chiar obținerea unui rezultat fals. În cazul unei palpări dificile se recomandă umezirea regiunii cervicale cu alcool [12].

Există și situații în care datorită dezvoltării excesive, masa tiroidiană hiperplaziată să migreze ventral spre intrarea pieptului, în mediastinul cranial [5].



Figura 2. Metoda de palpate a glandei tiroide la pisică [22].

Ținându-se cont de faptul că dezvoltarea embrionară a glandei tiroide se realizează din pungile faringiene, chiar și existența unei hiperplazii tiroidiene ectopice, a cărei poziție se poate întinde de la faringe spre cord, este posibilă, iar atunci când se suspectează prezența unei astfel de mase intratoracice, se recomandă dispunerea animalului vertical cu capul încăpușonat și realizarea examenului scintigrafic [3, 12].

Totuși, în ciuda acestor manopere, trebuie menționat faptul că, chiar dacă, la examenul fizic, palpator al glandei tiroide se constată mărirea unuia (90%) sau ambilor lobi, aceasta nu poate da un diagnostic cert de hipertiroidism [12, 18].

Testele de diagnostic preliminar

Diagnosticul de hipertiroidism trebuie să cuprindă rezultatele obținute din anamneză, examenul fizic al pisicii, modificările biochimice, hematologice, și a hormonilor tiroidieni.

Diagnosticul diferențial

Diagnosticul diferențial în hipertiroidismul felin se realizează față de toate afecțiunile care au ca și manifestări clinice aceleași semne ca și hipertiroidismul și vor fi prezentate în Tabelul 1.

Diagnosticarea dificilă a acestei afecțiuni se datorează faptului că nu toate semnele ce sunt observate la pacientul felin sunt specifice endocrinopatiei. Examinarea clinică a pacientului poate îndrepta veterinarul spre o altă afecțiune ce poate apărea primar sau secundar hipertiroidismului [4].

Tabelul 1.

Diagnosticul diferențial în hipertiroidismul felin [4]

Diagnostic diferențial	Semne clinice întâlnite și în hipertiroidism
Boli endocrine netiroidiene	
- diabetul zaharat	- poliurie, polidipsie, polifagie, slăbire
- hiperadrenocorticism (rar)	- poliurie, polidipsie, - polifagie, slăbire
- diabet insipid	- poliurie, polidipsie, slăbire ușoară
- acromegalie (rar)	- poliurie, polidipsie, polifagie
Afecțiuni renale	- poliurie, polidipsie, anorexie, slăbire, creșterea uremiei
Afecțiuni ale cordului	- detresă respiratorie, scădere în greutate, tahicardie, murmur, aritmie
- cardiomiopatia hipertrofică	
- cardiomiopatia congestivă	
- aritmia idiopatică	
Afecțiuni gastrointestinale	- creșterea volumului fecal, fecale urât mirositoare, scădere în greutate, polifagie
- insuficiență pancreatică exocrină	
- afecțiuni inflamatorii ale sistemului GI	-diaree, vomă,
- afecțiuni neoplazice la nivel GI	anorexie, slăbire cronică
Afecțiuni hepatice	- creșterea enzimelor hepatice
- modificări inflamatorii	
- modificări neoplazice	
Afecțiuni pulmonare	- detresă respiratorie

Modificările hematologice

Deși există modificări hematologice în hipertiroidism, acestea nu pot fi utilizate pentru diagnosticarea certă a acestei afecțiuni. Printre acestea se numără eritrocitoza ușoară spre moderată, creșterea hematocritului (Ht), a volumului eritrocitar mediu (VEM), a celulelor roșii și a concentrației de hemoglobină [5, 10, 11].

Aceste modificări par a fi rezultatul creșterii consumului de oxigen precum și a stimulării receptorilor β -adrenergici din măduvă, ceea ce se finalizează cu creșterea secreției de eritropoietină.

Stimularea producției de eritropoietină de către hormonii tiroidieni va duce la creșterea ratei de diferențiere a celulelor roșii și la scăderea timpului de maturare, cu eliberarea în circulație de reticulocite (20%).

Tabelul 2.

Sinteză după Mooney si Broussard [4]

Modificări hematologice	Procentaj pisici %
Hematocrit crescut	47
Volum eritrocitar mediu crescut	44
Celule roșii crescute	21
Hemoglobină crescută	17

Modificările de la nivelul celulelor albe, deși sunt rare, sunt reprezentate de leucocitoză cu neutrofilie, asociată frecvent cu infecțiile bacteriene, limfopenie, eozinopenie, acestea par a se datora răspunsului organismului la stres precum și a concentrației crescute de cortizol datorate hipersecreției hormonilor tiroidieni iodați [4, 5, 10, 11].

O complicație rară asociată hipertiroidismului este anemia, aceasta datorându-se creșterii ratei de formare a corpurilor Heinz, precum și a creșterii concentrației sangvine a factorului VIII, datorită creșterii activității adrenergice cu creșterea plachetelor sangvine ce favorizează tromboza intravasculară [4, 10, 11].

Modificările biochimice

În cazul pisicilor afectate de hipertiroidism, parametrii biochimici mai puțin importanți sau cu un rol de diagnostic redus, cu excepția prezenței unei afecțiuni non-tiroide concurente ce pot altera interpretarea rezultatelor, sunt: colesterolul, sodiul, clorul, bilirubina, albumina și globulina.

Dar spre deosebire de acestea există și alți parametrii biochimici ale căror modificări

au o importanță deosebită în diagnosticarea hipertiroidismului.

Astfel că, cel mai frecvent se observă modificări ale enzimelor hepatice reprezentate de alanin aminotransferaza (ALT), fosfataza alcalină (ALP) și aspartat aminotransferaza (AST).

Dintre toate enzimele prezentate, cel puțin una este crescută în aproximativ 90% din pisicile hipertiroide, iar această creștere pare a fi corelată cu concentrația hormonilor tiroidieni plasmatici.

Astfel că în unele studii realizate, concentrațiile de ALP erau corelate semnificativ cu concentrațiile hormonilor tiroidieni, iar cele ale ALP și ALT au scăzut în limitele de referință atunci când starea de eutiroidism a fost atinsă [10, 11].

În ceea ce privește statusul renal, hipertiroidismul și insuficiența renală sunt două afecțiuni comune pisicilor bătrâne.

Astfel că, aproximativ 20-25% din aceste pisici prezintă creșterea concentrației serice a ureei și a creatininei, iar alături de o densitate urinară cuprinsă între 1.008-1.020 ar trebui să ne indice posibilitatea unei afecțiuni renale concurente [12, 13].

Alterarea metabolismului osos este o altă consecință a hipertiroidismului, iar o creștere a activității ALP a fost asociată cu creșteri ale izoenzimelor osoase și hepatice.

Într-un studiu realizat pe 36 de pisici hipertiroide, a fost observată o creștere a izoenzimelor osoase la toate pisicile aparținând studiului respectiv, dintre care 44% au avut o creștere a osteocalcinei.

Și hiperfosfatemia a fost observată la aproximativ 35% din pisici, iar 50% din acestea prezentau o calcemie sub limita de referință [4].

Concentrația parathormonului (PTH) circulant este și ea modificată, astfel că hiperparatiroidismul a fost demonstrat la aproximativ 70% din pisicile hipertiroide la care concentrația parathormonului depășea de 19 ori limita superioară de referință [10].

În ciuda acestor modificări biochimice, până în prezent nu au fost observate semne clinice care să ateste alterarea metabolismului osos la pisicile cu hipertiroidism [4].

Alte modificări biochimice dar nesemnificative din punct de vedere clinic pot încadra o ușoară hiperglicemie, ce poate reflecta răspunsul la stres sau chiar un diabet zaharat preexistent.

În rare cazuri se mai poate constata o slăbiciune musculară severă corelată biochimic cu hiperkalemia.

Radiografia și untrasonografia cardiac

Datorită faptului că hipertiroidismul este de cele mai multe ori asociat cu cardiomiopatia hipertrofică reversibilă, se recomandă examinarea funcției cardiace alături de cele ale glandei tiroidiene.

În cadrul imaginii radiografice toracice, în aproximativ 50% din cazuri se observă o creștere moderată spre severă a cordului.

Această mărire este de cele mai multe ori însoțită de efuzie pleurală sau edem pulmonar la pisicile cu insuficiență cardiacă congestivă.

Cele mai frecvente modificări ecocardiografice sunt reprezentate de hipertrofia peretelui ventricular stâng (70%) (fig. 3), dilatație atrială (70%) și ventriculară stângă (45%), precum și hipertrofia septului interventricular (40% din cazuri) (fig. 4).

Toate aceste modificări cardiace sunt de cele mai multe ori reversibile după instaurarea tratamentului contra afecțiunii principale, hipertiroidismul.

Examinarea funcției cardiace este foarte importantă, în special datorită faptului că aceasta este frecvent asociată cu insuficiența cardiacă congestivă și mai puțin cu cardiomiopatia dilatativă [11].



Figura 3. Ultrasonografie se observă hipertrofia ventriculului stâng cu îngustarea spațiului ventricular (original, Pap).



Figura 4. Ultrasonografie, se observă hipertrofia septului interventricular cu reducerea camerei ventriculare (original, Pap)

Electrocardiografia

Cele mai frecvente modificări observate în hipertirozism cu ajutorul electrocardiografe sunt:

- tahicardia sinusală (aprox. 60% din pisici),
- creșterea amplitudinii undei R în derivația II (în 30-50% din cazuri).

Alte modificări observate dar mai rare sunt scurtarea intervalului QT, prelungirea duratei complexului QRS și aritmii atriale sau ventriculare.

Totuși în ultimele studii, aceste alterări au o prevalență mai mică, dar crește cea a blocării ramurii drepte a fasciculului His (figura 5). [4, 10, 11].



Figura 5. Electro-cardiograma cu bloc total de ramură dreaptă și bloc atrio-ventricular de gradul I și ischemie subendocardică (original, Pap)

În urma analizării electrocardiografei (parametrii de lucru 25 mm / s, 10 mm = 10 mv) prezentate în figura 5 și pe baza interpretării valorilor obținute prezentate în Tabelul 3 se pot observa caracteristicile specifice blocului atrio-ventricular de gradul I (intervalul PR:0,13 s), blocului total de ramură dreaptă (complexul QRS: 0,06 s/2mv) și ischemiei subendocardice (segmentul ST: 0,15 mv) datorată hipertrofiei miocardice.

Tabelul 3.
 Interpretarea electrocardiografei și prezentarea valorilor fiziologice

Valorile obținute pe EKG	Valorile fiziologice
FC= 94 b/min	FC=110-130 b/min
Unda P: 0,04s/2mv	<0,04 s
Intervalul PR:0,13 s	0,05-0,09 s
Complex QRS:0,06 s/2mv	<0,04 s
Segmentul ST:0,15 mv	<0,2 mv

Confirmarea diagnosticului

Confirmarea hipertiroidismului se realizează pe baza rezultatelor obținute la dozarea hormonilor tiroidieni totali sau liberi, prin intermediul testului de supresie cu Triiodtironină, a testului de stimulare cu TRH precum și a interpretării imaginii scintigrafice [16].

Măsurarea concentrației totale a hormonilor tiroidieni

În prezent, există numeroase modalități de a măsura concentrația serică a hormonilor tiroidieni, dintre care cele mai utilizate sau preferate, datorită costului scăzut și a disponibilității sunt:

- testul radioimunologic și
- immuno-absorbția enzimatică (ELISA) [2, 17, 18].

La pisici, spre deosebire de oameni, afinitatea de legare a proteinelor plasmatică este mai redusă, astfel că toate metodele utilizate pentru dozarea concentrației de hormoni tiroidieni totali utilizate la oameni trebuie să fie modificate pentru a depista concentrațiile reduse de hormoni tiroidieni circulanți la pisici [11].

Dintre cei doi hormoni tiroidieni, tiroxina (T_4) și triiodtironina (T_3), s-a ajuns la concluzia că măsurarea concentrației serice totale T_4 datorită sensibilității de diagnostic mai mare dar și datorită faptului că utilizând această metodă se elimină eventualele teste adiționale mult mai costisitoare și care necesită implicarea proprietarului sau un timp prea îndelungat până la obținerea și interpretarea rezultatelor.

Un alt avantaj este faptul că în hipertiroidism concentrația plasmatică de T_4 depășește în aproximativ 90% din cazuri limita superioară de referință, pe când concentrația serică de T_3 este normală, aceasta devenind detectabilă doar într-un hipertiroidism mai avansat [2, 18].

Se presupune că această concentrație plasmatică normală de T_3 întâlnită la pisicile cu hipertiroidism moderat se datorează mecanismului compensator de reducere a conversiei periferice de tiroxină în triiodtironină pe măsură ce producția de hormoni tiroidieni continuă să crească [16].

De obicei, în hipertiroidism, concentrația serică de T_4 este de 20 de ori mai mare decât cea a T_3 . Există și situații în care concentrația de T_4 este normală în ciuda prezenței semnelor clinice, mai mult sau mai puțin, caracteristice hipertiroidismului.

Această normalizare a concentrațiilor hormonale se datorează, cel mai probabil, fluctuației hormonilor tiroidieni și a supresiei date de anumite boli nontiroidiene asupra acestora [18].

Astfel că, între 20 și 30% dintre pisicile a căror concentrație serică de T_4 depășește limita superioară, suferă de o boală concurentă.

Recoltarea și analiza probei

- recoltarea probei de analizat
- trimiterea probei la un laborator atestat, iar dacă nu se trimite la laborator probele trebuie înghețate, deoarece concentrația serică de T_4 este stabilă pentru o perioadă de 8 zile

și nu este afectată de îngheț, dezgheț sau hemoliză

- tehnica de măsurare utilizează în laborator este RIA sau ELISA

Interpretarea

Interpretarea trebuie întodeauna realizată prin corelarea concentrațiilor hormonale obținute la laborator cu valorile de referință specifice hormonilor testați (Tabelul 4) dar și cu cele obținute la examenul fizic al pacientului și cu datele din anamneză care pot cuprinde modificări comportamentale sau fiziologice.

Tabel 4.

Interpretarea rezultatelor [17].

Concentrația serică totală de T ₄	Hipertiroidism (pisici)
<4.0 μg/dl	cel mai probabil, Da
3.0-4.0 μg/dl	posibil
2.5-3.0 μg/dl	nu se știe
2.0-2.5 μg/dl	cel mai probabil, Nu
> 2 μg/dl	Nu

Pentru confirmarea diagnosticului de hipertiroidism este necesară realizarea mai multor măsurători ale acestor hormoni tiroidieni, în special datorită bolilor concurente (ex. afecțiuni renale, hepatice, cardiace, diabet insipid, neoplasme), care supresează concentrația hormonilor tiroidieni, aceștia atingând valori sub limita inferioară de referință la pisicile extrem de bolnave.

În aceste cazuri, boala concurentă devine principala grijă a medicului veterinar, de care va depinde prognosticul animalului și abia după ce afecțiunea a fost stabilizată, concentrația plasmatică a tiroxinei crește peste limita de referință.

În cazul în care semnele clinice nu coincid cu valorile normale (Tabelul 5) ale hormonilor tiroidieni, T₃ și T₄, se recomandă repetarea testelor de evaluare a funcției tiroide (măsurarea T₄ și T₃, examenul fizic complet, teste biochimice ale sângelui, diagnostic imagistic), pentru excluderea prezenței unei boli concurent. Măsurarea concentrației serice de T₄ / T₃ se face după aproximativ 1-2 săptămâni deoarece există

fluctuații ale acestora de ordinul orelor sau zilelor [18].

Tabelul 5

Valorile normale ale T₄ și T₃ [17].

T ₄	1.0 - 4.0 μg / dl
T ₄ liber	1 - 4 ng / dl
T ₃	4 - 1,6 ng / ml

Totuși, la unele pisici este necesar un timp de aproximativ 3-6 luni pentru a obține valoarea reală a acestor hormoni. Dacă după o a doua măsurare, concentrația hormonilor tiroidieni este, de această dată, peste limita superioară, hipertiroidismul este în continuare suspectat și se recomandă măsurarea concenctrație serice de T₃ liber, testul de supresie cu T₃.

Măsurarea concentrație hormonilor tiroidieni liberi

Determinarea concentrațiilor de hormoni tiroidieni liberi este considerat un test dificil de efectuat datorită necesității de depistare a unei concentrații reduse de hormoni liberi, în condițiile în care 99,5% din hormoni circulă legați de proteinele transportoare.

La momentul actual, aceste determinări se realizează prin 2 metode, cea de ultrafiltrare și prin dializă echilibrată [8, 16].

Deoarece doar fracțiunea liberă este disponibilă celulelor, măsurarea acesteia ar trebui să reflecte mai precis statusul funcției glandei tiroide, decât concentrația de tiroxină liberă, ce nu este influențată de bolile concurente [16].

Atât T₃, cât și T₄ liber reflectă foarte bine hipertiroidismul, măsurarea tiroxinei libere indicând, de cele mai multe, în 98% din cazuri, o concentrație crescută.

Există mai multe situații în care semnele clinice nu coincid cu concentrațiile serice ale hormonilor tiroidieni. Astfel că, în 95% din cazuri, o concentrație crescută de T₄ liber corelată cu o concentrație normală de T₄ total, se datorează fie unui hipertiroidism moderat sau a fluctuațiilor hormonale, fie unui efect supresiv dat de prezența bolilor concurente [16].

Utilizarea metodei de dializă de echilibru este din păcate, costisitoare, iar posibilitățile apariției erorilor de diagnostic sunt mai mari (ex: depozitarea probei la 37° timp de 7 zile, determină creșterea concentrației de T₄ liber cu până la 160%, această creștere datorându-se degradării globulinei de legare sau prin scăderea afinității acesteia pentru tiroxină), precum și a prevalenței crescute a concentrației ridicate de tiroxină totală la pisicile cu hipertiroidism (aprox. 90%).

Iar din punct de vedere economic măsurarea tiroxinei totale, fără cea a tiroxinei libere este mai frecvent realizată.

Totuși, măsurarea acesteia se recomandă atunci când se suspectează prezența hipertiroidismului, cu o concentrație serică totală de T₄ cuprinsă în limita de referință, iar semnele clinice trădează prezența hipertiroidismului [16].

Un dezavantaj important al acestei metode de măsurare a T₄ liber este pierderea specificității de diagnostic la pisicile bolnave și eutiroidice.

Observându-se faptul că până la 12% din pisicile bolnave, dar eutiroidice au o concentrație crescută de T₄.

În aceste situații se recomandă măsurarea concentrației de T₄ total, liber și corelarea acestora cu rezultatele obținute din istoric, anamneză, examinarea fizică și semnele clinice relatate de proprietar.

În cele mai multe cazuri măsurarea concentrației de tiroxină liberă nu are o valoare de diagnostic mare, iar confirmarea diagnosticului poate fi falsă datorită prezenței frecvente a bolilor nontiroide (18).

Totuși, în ciuda acestor dezavantaje, în ultimele studii, autorii atestă faptul că măsurarea concentrației libere de T₄ utilizând dializa de echilibru reprezintă următorul pas în diagnosticarea hipertiroidismului, eliminând astfel testele costisitoare cum ar fi cel de stimulare cu TRH (2).

Situațiile posibile sunt reprezentate de obicei de concentrații diferite între T₄ liber și

T₄ total, fiecare din acestea reprezentând modificările funcției tiroide și sunt reprezentate în Tabelul 6.

Tabelul 6.

Corelarea concentrațiilor de hormoni tiroidieni cu tipul de afecțiune [17].

Concentrația serică de T ₄ liber	Concentrația serică de T ₄ total	Afecțiunea/Boala
> LR	< LR (10nm/L)	- nontiroidiană
> LR	> LR (25nm/L)	- sugerează hipertiroidism
> LR	< LR/N	- nontiroidiană moderată
> LR	> N	- nontiroidiană - fluctuații hormonale - hipertiroidism moderat
> LR	> LR	- confirmare hipertiroidism

Unde: LR = limita de referință;

N = normal, cuprinsă în limita de referință

Atunci când nu este posibilă măsurarea concentrației libere de tiroxină, iar pisicile prezintă semne clinice evidente, nodul palpabil și o concentrație serică de tiroxină totală în limite normale se recomandă examinarea funcției tiroidiene utilizând testul de supresie cu T₃ sau testul de stimulare cu TRH.

Testul de supresie cu triiodtironină

Acest tip de măsurare este utilizat la pisicile suspectate de hipertiroidism la care rezultatele obținute prin măsurarea concentrației serice de T₄ și T₃ totale sunt nondiagnostice.

Acest test utilizează mecanismul normal de reglare hipofizo-tiroidiană unde concentrația crescută de hormoni tiroidieni circulanți inhibă secreția de TSH de la nivelul adenohipofizei.

Astfel că, administrarea exogenă de triiodtironină (T₃) la pisicile eutiroidice are ca rezultat scăderea concentrației serice de tiroxină (T₄).

În mod contrar, când funcția glandei tiroide este autonomă, adică independentă de secreția hipofizară de TSH administrarea exogenă de hormoni tiroidieni determină modificări reduse sau chiar absente asupra funcției tiroidiene [18].

Acest fenomen se datorează faptului că secreția de TSH a fost deja cronic depresată.

Modul de acțiune

- se recoltează o probă de sânge pentru determinarea concentrației bazale totale de T_4 și T_3
- se centrifughează proba, iar serul obținut se păstrează refrigerat
- proprietarii sunt instruiți ca timp de 2 zile să le administreze pisicilor de aproximativ 7 ori T_3 exogen, se găsește sub denumirea comercială de Cytomel, Bristol.

Astfel că în următoarele 2 zile proprietarii vor administra Cytomel în doză de 25 μg , de 3x1 / zi, iar în dimineața celei de-a 3-a zi încă o doză. Ulterior, în maxim 2-4 ore pisica este adusă la cabinet pentru recoltarea unei noi probe de sânge. Atât serul păstrat, cât și proba nou recoltată vor fi trimise la laborator în vederea măsurării concentrației totale de T_3 și T_4 . [17].

Rezultatele obținute

În ceea ce privește interpretarea rezultatelor obținute la pisicile eutiroidice administrarea de liotironină rezultă într-o scădere marcantă a tiroxinei, pe când la pisicile hipertiroide supresia secreției de tiroxină este absentă. Acest rezultat face ca liotironina să fie cea mai bună modalitate de diferențiere a pisicilor hipertiroide față de cele cu boli concurente nontiroide.

Astfel că la pisicile cu hipertiroidism, concentrația de T_4 după administrarea liotironinei depășește 20 nmol / L (aprox. 1,5 $\mu\text{g}/\text{dL}$), iar la pisicile eutiroidice sau cu boli concurente, concentrația este sub 20 nmol/L .

Dezavantajul acestui test este reprezentat de durata acestuia, dar și de faptul că implică administrarea medicației de către proprietari, la care se mai adaugă și faptul că tabletele sunt dificil de administrat la pisici, mai ales de către persoanele fără experiență, cum sunt proprietarii lor.

Consecința administrării neadecvate va avea ca și rezultat concentrația serică de T_3 identică cu cea de dinainte, astfel că, secreția hipofizară de TSH nu va fi inhibată.

Nici valoarea serică de T_4 nu va fi supresată, chiar și atunci când axa hipofizo-tiroidiană este normală. Măsurarea concentrației serice de T_3 utilizând acest test nu pare a avea valoare de diagnostic, dar poate fi utilizat pentru monitorizarea capacității proprietarilor de a administra tratamentul. Iar lipsa supresiei serice de T_4 ne duce cu gândul la o administrare neadecvată de liotironină. Toate aceste deviații de la normal ale hormonilor tiroidieni, indiferent că vorbim de tiroxină sau de triiodtironină sunt date de numeroși factori, cum ar fi obezitatea, administrarea diferitelor medicații, și sunt relatate în Tabelul 7.

Tabelul 7.

Factorii ce modifică valorile normale de T_4 , T_4 liber, T_3 și TSH [17].

Obezitatea	Crește
Slăbirea	Scade T_4 ,
Exerciții intense	Cresc T_4 , scad TSH,
Gestația	Crește T_4
Bolile concurente	Scad T_4 total și liber depinzând de boală TSH crește sau scade
Carprofen	Scade T_4 , TSH și T_4 liber
Glucocorticoizii	Scad T_4 și T_4 liber, scade/nu TSH
Metimazol	Scade T_4 și T_4 liber, crește TSH
Fenobarbital	Scade T_4 și T_4 liber,
Progesteragenii	Scad T_4
Sulfamide	Scad T_4 și T_4 liber, cresc TSH

Scintigrafia lobilor tiroidieni

Scintigrafia este o metodă de diagnostic imagistic de mare sensibilitate considerată metoda de bază în diagnosticarea pisicilor cu hipertiroidism moderat.

Una din principalele avantaje prezentate și în tabelul 8 este depistarea tumorilor tiroidiene, îndeosebi a celor cu localizare ectopică și oferă medicului veterinar informații despre glanda tiroidă atât din punct de vedere anatomic cât și funcțional ajutând la confirmarea diagnosticului de hipertiroidism și instaurarea tratamentului.

Un alt avantaj al scintigrafiei este utilizarea acesteia la pisicile la care concentrațiile libere de T_4 nu corelează cu manifestările clinice, deoarece la aproximativ 6-12% din aceste pisici hipertiroide nu apar modificări în ceea ce privește concentrația serică de T_4 . Afecțiunile non-tiroidiene pot

modifica concentrațiile hormonilor tiroidieni conducând la erori în diagnosticarea afecțiunii suspectate [1, 9, 20].

Tabelul 8.

Principalele indicații ale scintigrafiei tiroidiene [6].

evaluarea statusului funcțional al glandei tiroidiene
determinarea gradului de implicare al lobilor tiroidieni, unilateral sau bilateral
detectarea și localizarea țesutului iroidian ectopic
diferențierea naturii bolii tiroidiene, maligne sau benigne
determinarea originii masei cervicale
detectarea masei metastazice
evaluarea eficacității terapiei
depistarea eventualelor țesuturi reziduale după tiroidectomie

Una din *dezavantajele* acestei metode de diagnostic este lipsa unităților special echipate și a personalului licențiat în a utiliza și interpreta rezultatele obținute [9, 20].

Metoda de lucru

Scintigrafia veterinară utilizează ca și marker radioactiv pertechnetatul de sodiu sau iodul radioactiv. Inițial specialiștii au folosit ca și marker radioactiv pertechnetatul de sodiu care era administrat intravenos și ce necesita un timp de 20 de min înaintea realizării imaginii scintigrafice, ulterior calea intravenoasă fiind înlocuită cu cea subcutanată [1].

În prezent, numeroase clinici specializate, de exemplu clinica Hipurrcat, SUA, utilizează ca și marker iodul radioactiv. Astfel că medicul veterinar injectează o doză redusă de iod radioactiv subcutanat.

În următoarea oră, această doză va fi absorbită de lobii glandei tiroide dar și de glandele salivare într-un raport de 1:1 iodul radioactiv prezent în glanda tiroidă dar și cele din glandele salivare vor emite raze Gamma ce vor fi preluate de o cameră Gamma pentru a forma imaginea [20].

Pentru realizarea acestei manopere, pisica este poziționată normal, ventral pe cameră (figura 6) sau este poziționată latero-lateral pe cameră. Această manoperă durează mai puțin de un minut, timp în care

camera gamma formează imaginea. Aceasta nu necesită anestezia pacientului [6, 20].



Figura 6. Poziționarea ventrală a pisicii în vederea scintigrafiei (Clinica Hipurrcat) [20]

La pisicile eutiroidice, lobii tiroidieni la scanarea radionucleară apar ca două zone de acumulare radionucleară, ovale, bine definite, simetrice atât în dimensiune cât și ca poziționare. Cum am mai menționat, glanda tiroidă și glandele salivare vor absorbi acest marker în cantități egale, un raport de 1:1 și vor fi vizibile la scanarea radionucleară. Acestea pot fi utilizate pentru calcularea cantității de iod radioactiv absorbit de glanda tiroidă față de glandele salivare (figura 7) [6, 20].

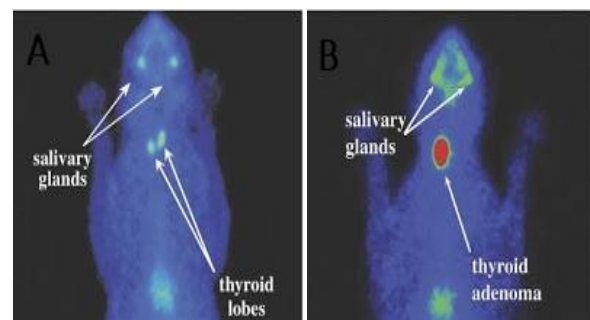


Figura 7. Aspectul lobilor tiroidieni și glandelor salivare la o pisică eutiroidă (A) și aportul diferit de iod radioactiv, în favoarea unui lob tiroidian (adenom) (B) [20].

La pisicile hipertiroide aspectul lobilor tiroidieni poate fi observat cu ușurință datorită aportului crescut de iod radioactiv, iar raportul glanda tiroidiană-glanda salivară se modifică în defavoarea glandelor salivare care acum sunt aproape nesensibile (figura 8) [6].

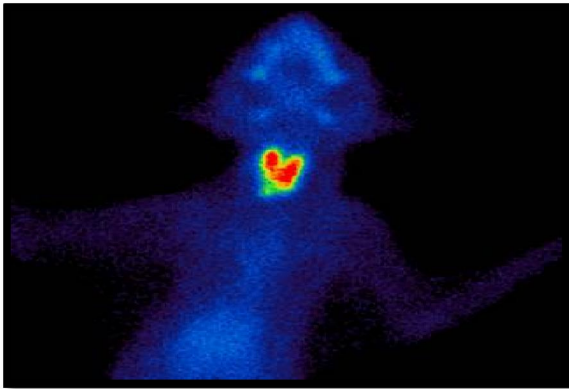


Figura 8. Evidențierea lobilor tiroidieni măriți [21]

Concluzii

În momentul de față, în România pentru depistarea hipertiroidismului se folosește doar măsurarea concentrației totale și libere a hormonilor tiroidieni și nu pentru că este o metodă mai utilă sau mai puțin costisitoare, ci, pentru că în prezent, nu dispunem de clinici corect echipate cu aparatură adecvată demersului, cum ar fi scintigraful și iodul radioactiv.

Bibliografie

1. **Broome RM** (2006). Thyroid scintigraphy in hypothyroidism, *Clin Tech Small Anim Pract* 21:10-16
2. **Bruyette DS** (2004). Choosing the best tests to diagnose feline hyperthyroidism Available at: <http://veterinarymedicine.dvm360.com/vetmed/Diagnostic+Center/Choosing-the-best-tests-to-diagnose-feline-hyperth/ArticleStandard/Article/detail/132520>
3. **Farese PJ**. (2013) *Endocrine System, Small animal soft tissue surgery*, ed. Wiley-Blackwell pg. 23-81.
4. **Feldman EC, Nelson RW** (2004). *The thyroid gland, Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, 3rd edition, Eds. Feldman EC and Nelson RW, Ed. Saunders, St. Louis, Missouri, USA, P. 153-202
5. **Fossum TW** (2013). Surgery of the Endocrine System, *Small animal surgery*, Ed. Elsevier, 4th edition, pg. 633-685.
6. **Gregory MB, Neelis DA** (2014) Thyroid scintigraphy in veterinary medicine, *Semin Nucl Med* 44:24-34
7. **Herrtage ME** (2000). *Disease of the endocrine system. In: Textbook of Small Animal Medicine*, Edit. John KD, Ed. Saunders, London, UK, pp. 526-573
8. **Koulouri O, Moran C, Halsall D., Chatterjee K, Gurnell M** (2013) Pitfalls in the measurement and interpretation of thyroid function tests, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 27: 745-762
9. **Mooney CT** (2010). *Endocrine disorders, Textbook of Veterinary Internal Medicine Expert Consult*, 7th, vol. 2, ed. Saunders, pg. 1325-1601.
10. **Mooney CT, Rand JS, Fleeman LM**. (2004) The endocrine system, *Feline Medicine and Therapeutics*, 3rd edition, Blackwell Publishing, pg. 527-568
11. **Mooney CT, Peterson ME** (2004). Feline Hyperthyroidism. In: *Manual of Canine and Feline Endocrinology*, 3rd edition, Edit. Mooney CT, Peterson ME, Ed. British Small Animal Veterinary Association, Dorset, England, p. 96-111,
12. Nelson R. (2009) - *Endocrine disorders. În: Small Animal Internal Medicine*, 4th edition, Edit. Nelson R, Couto G, Ed. Mosby Elsevier, Missouri, USA, p. 695-850
13. **Norworthy GD, Crystal MA** (2011). *Hyperthyroidism, The Feline Patient*, ed. Wiley-Blackwell, pg.256-260.
14. **Pap A, Cristina RT** (2013). Farmacoterapia hipertiroidismului la pisici, *Medicamentul Veterinar*, 7(2): 3-17.
15. **Peterson ME** (2006), Diagnostic tests for hypothyroidism in cats, *Clin tech Small Anim Pract* 21: 2-9.
16. **Grant RW, Michael HT** (2004). *Endocrine, Metabolic and Lipid Disorders, Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, 4th, edit. Willard T., Ed. Saunders, St. Louis Missouri, USA pp. 165-207.
17. **Rijnberk AD, Kooistra HS** (2010). Thyroids, *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats*, 2nd edition, ed. Schlutersche, pg. 55-78.
18. **Scherk M** (2011) <http://veterinarycalendar.dvm360.com/avhc/Medicine/An-update-in-feline-endocrine-diseases/Proceedings/ArticleStandard/Article/detail/821631?contextCategoryId=47603>
19. http://animalendocrine.blogspot.ro/2011/09/confirming-diagnosis-of-hyperthyroidism_10.html
20. <http://www.icatcare.org/advice/cat-health/hyperthyroidism-overactive-thyroid-gland>
21. http://vetbook.org/wiki/cat/index.php/Thyroid_manual_palpation



SUPER KILLER

INSECTICID CONCENTRAT



Super Killer combate:

gândacii ✓	muștele ✓
puricii ✓	moliile ✓
păduchii ✓	păienjenii ✓
ploșnițele ✓	țânțarii ✓
căpușele ✓	viespile ✓



Soluția de stropit se prepară astfel:

- Țânțari, păduchi, muște, furnici - 4ml Super Killer / 1litru apă.
- Gândacii, puricii, păienjenii, molii, viespi, căpușe - 8ml Super Killer / 1 litru apă.

Se va utiliza numai soluția diluată, proaspăt preparată și bine omogenizată.

Remanență: 6 - 8 săptămâni.

ATENȚIE:
Nu se va utiliza la stropitul plantelor și semințelor destinate consumului uman.
Nu se aplică pe echipamente electrice.
Produs autorizat conform avizului nr. 1328BIO/18/06.10

Distribuitor: S.C. Farmavet S.A.
Calea Giulești nr. 333, Sector 6, București
Tel. +4021.221.99.60; Fax +4021.220.69.32
E-mail: office@farmavet.ro; Web: www.farmavet.ro



Determinarea impurităților și produșilor de degradare din produsele medicinale veterinare prin metode HPLC

Determination of impurities and degradation products from veterinary medicinal products by HPLC method

Elena Gabriela Oltean

Sc Romvac Company SA

Cuvinte cheie: *impuritati, produși de degradare, HPLC, stabilitate*

Key words: *impurities, degradation products, HPLC, stability*

Rezumat

Impuritățile organice sau anorganice din produsul medicinal veterinar pot proveni din materiile prime, din procesul de fabricație, dintr-o purificare incompletă, dintr-o conservare necorespunzătoare. Limitele admise pentru impurități în cadrul preparatelor farmaceutice se apreciază prin comparare cu soluții etalon, conform monografiilor corespunzătoare. Studiile de degradare forțată definesc stabilitatea metodei de dozare a compușilor activi și a întregului produs finit în condiții excesive, de degradare accelerată. De asemenea furnizează informații privind căile de degradare și selectivitatea metodelor analitice aplicate. Informațiile furnizate de către studiile de degradare aplicate asupra compusului activ și produsului farmaceutic final trebuie să demonstreze specificitatea metodei analitice față de impurități. Studiile de degradare forțată trebuie să demonstreze că impuritățile și produșii de degradare rezultați nu interferează cu compusul activ. Metodele curente de degradare forțată se referă la hidroliza acidă, hidroliza bazică, oxidarea, expunerea la temperatura și lumina produsului medicinal. Metodele HPLC reprezintă un instrument analitic integral în analiza stabilității produsului medicinal. Metoda HPLC trebuie să poată separa, detecta și cuantifica diferiți produși specifici de degradare, care pot rezulta în urma preparării sau conservării produsului medicinal, precum și entitățile nou apărute în urma sintezei. Ghidurile FDA și ICH recomandă introducerea în documentația necesară punerii pe piață a produsului medicinal a rezultatelor, inclusiv cromatogramele specifice produsului medicinal supus degradării forțate. De asemenea, utilizarea metodelor HPLC în studiile de degradare forțată aplicate asupra produselor medicinale oferă informații importante asupra condițiilor de stabilire a formulei preparatului medicinal, de sinteză a acestuia, a modalităților de ambalare și a conservabilității acestora.

Abstract

The organic or inorganic impurities in the veterinary medicinal product can derive from starting materials, manufacturing process, incomplete purification, inappropriate storage. The acceptable levels of impurities in pharmaceuticals are estimated by comparison with standard solutions, according to the appropriate monographs. Forced degradation studies determine the stability of the method of dosage for the active compounds and for the entire finished product under excessive accelerated degradation conditions. They also provide information on degradation pathways and selectivity of analytical methods applied. The information provided by the degradation studies on the active compound and finished pharmaceutical product should demonstrate the specificity of the analytical method regarding impurities. Forced degradation studies should demonstrate that the impurities and degradation products generated do not interfere with the active compound. The current forced degradation methods consist of acid hydrolysis, basic hydrolysis, oxidation, exposure of the medicinal product to temperature and light. HPLC methods are an integral analytical instrument for the analysis of the medicinal product. The HPLC method should be able to separate, detect and quantify various specific degradation products that can appear after manufacture or storage of the medicinal product, as well as new elements appearing after synthesis. FDA and ICH guidelines recommend the enclosure of the results, including the chromatograms specific to the forced degradation-subjected medicinal product, in the documentation for marketing authorization. Using HPLC methods in forced degradation studies on medicinal products provides relevant information on the method of determination for the formulation of the medicinal product, synthesis product, packaging methods and storage.

Introducere

Cromatografia de lichide de înaltă performanță HPLC reprezintă un instrument analitic important utilizat pentru studiul stabilității produselor medicinale [12, 13].

Metodele HPLC permit separarea compușilor individuali prezenți într-un amestec, identificarea și cuantificarea fiecărui component.

Cromatografia poate fi descrisă ca un proces de transfer de masa care implică adsorbția.

În metodele HPLC, datorită presiunii înalte de lucru, proba de analizat este trecută împreună cu faza mobilă printr-o coloana cromatografică umplută cu un sorbent – faza staționară, conducând la separarea compușilor din probă [12, 13].

Presiunea de lucru poate atinge 400 – 600 bari, permitând separarea compușilor în timp scurt, comparativ cu metodele clasice cromatografice, care se bazează pe separarea la presiune gravitațională.

Compusul activ din coloana cromatografică este un material granular format din particule de siliciu sau diferite tipuri de polimeri.

Componentii dintr-un amestec sunt separate pe baza gradelor diferite de interacțiune cu particulele fazei staționare.

Faza staționară este alcătuită dintr-un amestec de solvent (metanol, acetonitril, apă). În procesul de separare un rol important îl are temperatura de lucru, prin influența asupra interacțiunilor între compusul de analizat și faza staționară [1].

Aceste interacțiuni sunt: **fizice, de tip hidrofob, dipol – dipol, ionice**, sau combinații ale acestora. În alegerea fazei staționare și a fazei mobile se ține cont de structura chimică a compusului de analizat [1, 2].

Schema unui cromatograf de lichide de înaltă presiune cuprinde: **pompa, autosampler-ul, detectorul și compartimentul fazei mobile (solventilor)**. Cu ajutorul pompei proba de analizat este trecută prin coloana cromatografică, ajungând la detector [12].

Detectorul generează un semnal proporțional cu cantitatea de proba trecută prin coloana, permitând astfel analiza cantitativă.

Prelucrarea datelor este făcută cu ajutorul unui software specific fiecărui producător de echipamente HPLC.

Pompa poate lucra în gradient (în acest caz este posibilă modificarea fazei mobile și a fluxului de solvent la diferite intervale de timp, permitând separarea fină a compușilor unui amestec) sau liniar.

Detectorul poate fi de tip: **UV / VIS, diode array (PDA), detector de conductivitate, detector de fluorescență, detector de indice de refracție, detector electrochimic, spectrometru de masă**.

În funcție de structura chimică a compușilor de separat și de caracteristicile fazei staționare (coloana cromatografică) metodele cromatografice se disting metode cromatografice cu faza normală, cu faza inversă, de excludere moleculară, de schimb ionic, de bio-afinitate.

La trecerea prin coloana cromatografică compușii dintr-un amestec sunt reținuți la timpi diferiți – timp de retenție - în funcție de afinitatea acestora pentru coloana și de procesele de partiție realizate între faza staționară și faza mobilă.

Timpul de retenție este influențat de tipul de eluent (faza mobilă), compoziția fazei mobile, tipul de faza staționară, natura analitului.

Eficiența și selectivitatea fazei staționare sunt parametri intrinseci ai coloanei cromatografice, și depind de tipul de faza staționară, lungimea coloanei, diametrul particulelor fazei staționare, viteza de curgere prin coloana (fluxul), temperatura, prezența compușilor ionizabili.

Metodele HPLC utilizate în controlul produselor medicinale trebuie să poată furniza informații cu privire asupra identității, purității și stabilității pe perioada de conservare a compusului activ [2-4].

Metoda analitică trebuie să cuantifice riguros compusul activ, de interes, fără să

interfereze cu eventualele impurități prezente în materia primă sau cele rezultate în urma procesului de fabricație și nici cu produsii rezultați prin degradare forțată aplicată asupra produsului medicinal [1-5].

În cazul prezenței mai multor compuși activi în produsul medicinal, metoda HPLC trebuie dezvoltată astfel încât să permită separarea acestora – rezoluția metodei.

Metoda HPLC trebuie să furnizeze informații asupra purității peak-ului compusului activ de interes, ținând cont de influența fazei mobile și a solventului de extracție [12, 13].

Studiile de degradare forțată

Conform documentelor ICH și FDA validarea unei metode HPLC furnizează informații asupra stabilității produsului medicinal analizat, procedura analitică având capacitatea de a detecta modificările dependente de timp ale proprietăților compusilor activi. O astfel de metodă poate cuantifica cu acuratețe compușii activi, fără interferența cu produșii de degradare, impuritățile intrinseci, excipienții sau alte impurități potențiale [7-11].

Aceste metode furnizează informații asupra modului de eliberare a compusului activ și a produsului medicinal, compatibilitatea excipienților, influența modului de ambalare. Studiile de degradare forțată aplicate asupra unui compus activ sau unui produs medicinal vor furniza, de asemenea, informații asupra căilor de degradare ale acestora, diferențierea între produșii de degradare datorăți compusului activ și cei rezultați din degradarea excipienților, elucidarea structurii produșilor de degradare, determinarea stabilității intrinseci a moleculei compusului activ în soluție și în formă solidă, mecanismele de degradare termică, hidrolitică, oxidativă și fotolitică ale substanței active și compusului medicinal [11].

Experimentele de degradare forțată sunt realizate astfel încât să se obțină

degradarea controlată a produsului medicinal, respectiv compușilor activi, pentru observarea modului de eluție în metoda HPLC.

Prin expunerea probelor la condiții extreme de tipul temperaturii, radiației luminoase, domeniului larg de pH și agenților oxidanți, se obțin compuși degradați parțial care pot fi analizați prin HPLC în scopul determinării interferențelor dintre peak-urile datorate compușilor activi și cele ale substanțelor înrudite [7-11].

Scopul este obținerea unei degradări de 10%; orice degradare suplimentară de până la 30% face subiectul unei degradări secundare, de aceea se recomandă conducerea experimentelor în acest domeniu (10%).

Documentele reglementarilor FDA și ICH furnizează definiții utile și comentarii generale asupra studiilor de degradare, însă informații puține cu privire la strategiile și principiile de bază pentru realizarea studiilor de degradare forțată (ex. în cazul medicamentelor slab solubile sau compușilor stabili)[3-9].

Degradarea excesivă a unei molecule poate conduce la profile de degradare care nu sunt reprezentative pentru condițiile de stocare și pentru devoltarea metodelor de preparare și analiză a produsului medicinal.

Astfel, studiile de degradare trebuie să nu fie excesive. Trebuie stabilit un echilibru între cantitatea de agent degradant și timpul de degradare, deoarece anumiți factori pot să nu conducă la o degradare semnificativă. Pentru fiecare tip de degradare se prepară câte o probă martor, pentru a discrimina între background și proba degradată [11].

Experimentele de degradare forțată se pot aplica și asupra compusului activ / excipienți pentru observarea căilor de degradare a substanței de interes.

De asemenea trebuie luate în calcul interacțiunile care pot apărea între compusul de interes și capsula / filmul protector.

Condițiile de degradare se ajustează în funcție de fiecare compus activ de interes,

deoarece apar diferențe de răspuns legate de solubilitate sau stabilitatea extremă la anumite condiții. Ducerea la extrem a condițiilor de degradare forțată poate conduce la rezultate inexacte,

neconcludente pentru studiile ulterioare de stabilitate și conservabilitate a produsului după expunerea de durată, semnificativă (Tabelele 1 și 2).

Tabelul 1.

Exemple de condiții de degradare forțată aplicate compusului activ și produsului medicinal

Substanța activă		Produs medicinal		
Solid	Soluție / Suspensie	Solid	Semisolid	Soluție/ Suspensie
Fotoliza Termoliza Temperatura Umiditate	Hidroliza acida/ bazica Oxidare	Fotoliza Oxidare Temperatura/ Umiditate	Fotoliza Oxidare Termoliza Temperatura/ Umiditate	Fotoliza Oxidare Termoliza

Tabelul 2.

Condiții generale de studii de degradare forțată

Tip de degradare	Condiții experimentale	Condiții de stocare
Hidroliza acida	HCl 0.1 N, HCl 0.5 N, HCl 1N	15, 60, 90 min.
Hidroliza bazica	NaOH 0.1 N, NaOH 0.5 N, NaOH 1 N	15, 60, 90 min.
Oxidare	H ₂ O ₂ 3%, H ₂ O ₂ 10%	15, 60, 90 min.
Termoliza	60°C, 80°C,	60, 90 min.; 24, 48 h
Termoliza/ Umiditate	60°C/ 75%RH, 80°C/ 75%RH	60, 90 min.; 24, 48 h
Fotoliza	250 w/ m ²	24, 48 h

Modelul experimental

Studiile de degradare forțată trebuie să cuprindă toată gama de metode de liza (hidroliza oxidativă, hidroliza acidă, hidroliza bazică, fotoliza, termoliza), pentru a avea o imagine de ansamblu a tuturor posibilităților de degradare a compusului de interes și a produsului medicinal, evaluându-se astfel stabilitatea și conservabilitatea acestora.

Prin cumularea rezultatelor obținute în urma tuturor condițiilor de degradare se obțin informații asupra cailor de degradare a substanței de interes, facilitând punerea la punct a metodei de preparare și ambalare a produsului medicinal.

Condițiile inițiale se stabilesc pentru a se obține o degradare de aproximativ 10%, în funcție de rezultatele obținute putând interveni modificări ale concentrației agentului degradant și / sau timpului de expunere la acesta. Prepararea probelor pleacă de la concentrații ale substanței de interes cuprinse între 0.5 – 1 mg/ml.

Parametrii cromatografici urmăriți în studiile de degradare forțată sunt:

- aria,
- înălțimea,
- asimetria peak-ului de interes,
- rezoluția între peak-ul compusului de interes și peak-ul imediat anterior (sunt acceptate rezoluții mai mari decât 1.0),
- procentul de degradare,
- aria peak-ului standardului compusului de interes,
- numărul de talere teoretice și
- factorul de capacitate a coloanei (parametri care indică eficiența coloanei cromatografice și sensibilitatea metodei HPLC utilizată în studiu) [2, 10, 11].

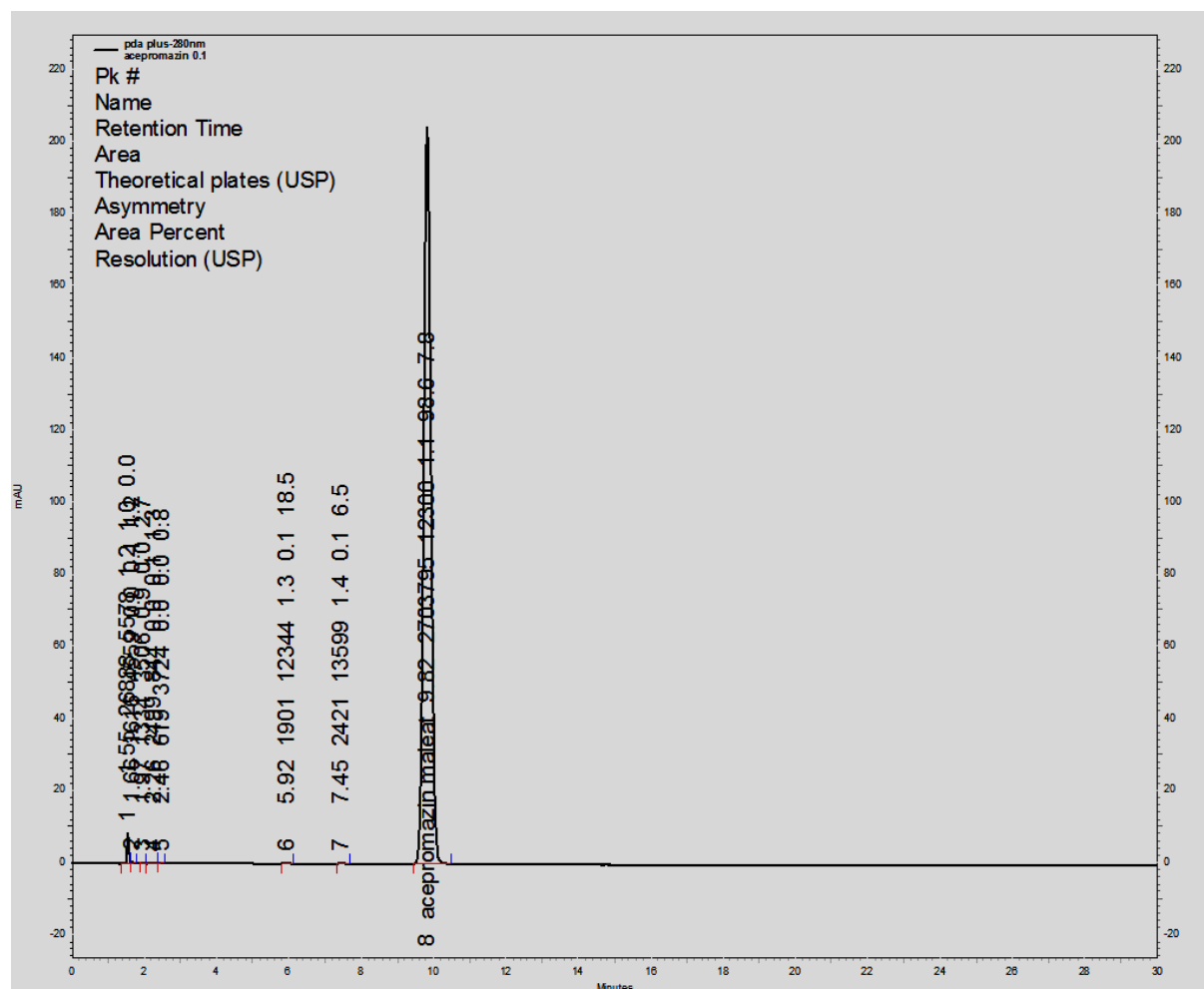
Experimentele de degradare forțată se pot realiza și prin cumularea a două condiții – de exemplu cuplarea hidrolizei acide/ bazice cu termoliza, însă numai după ce au fost studiate separat. În cazul degradării oxidative cu H₂O₂ se recomandă lucrul la temperatura camerei, deoarece încălzirea

excesiva a peroxidului de hidrogen duce la formarea de radicali alcoxil. Radicalii alcoxil sunt foarte reactivi, amplificând procesul de degradare. Prin adăugarea, de exemplu, de

metanol în mediu, efectul oxidativ este dus la extrem (Tabelul 3).

Tabelul 3.**Model experimental de studiu a degradării forțate**

Indicator de degradare	Substanța activă	Reagent adăugat	Condiții de lucru	Diluția	Concentrația finală
Standard de referință	1 ml soluție stoc 1 mg/ml standard	-	Diluare la concentrația finală	9 ml diluant pentru metoda HPLC	0.1 mg/ml
Soluție acida	1 ml soluție stoc 1 mg/ml standard	1 ml HCl 0.1 N	90 min.	8 ml diluant pentru metoda HPLC	0.1 mg/ml
Soluție bazica	1 ml soluție stoc 1 mg/ml standard	1 ml NaOH 0.1 N	90 min.	8 ml diluant pentru metoda HPLC	0.1 mg/ml
Control acid	-	1 ml HCl 0.1 N	-	9 ml diluant pentru metoda HPLC	-
Control bazic	-	1 ml NaOH 0.1 N	-	9 ml diluant pentru metoda HPLC	-
Soluție oxidanta	1 ml soluție stoc 1 mg/ml standard	1 ml H ₂ O ₂ 3%	15 min.	8 ml diluant pentru metoda HPLC	0.1 mg/ml
Control oxidant	-	1 ml H ₂ O ₂ 3%	-	9 ml diluant pentru metoda HPLC	-
Caldura	1 ml soluție stoc 1 mg/ml standard	-	2 h - 60°C	9 ml diluant pentru metoda HPLC	0.1 mg/ml
Lumina	1 ml soluție stoc 1 mg/ml standard	-	60 min - 250 w/m ²	9 ml diluant pentru metoda HPLC	0.1 mg/ml

**Figura 1. Compus activ nedeegradat**

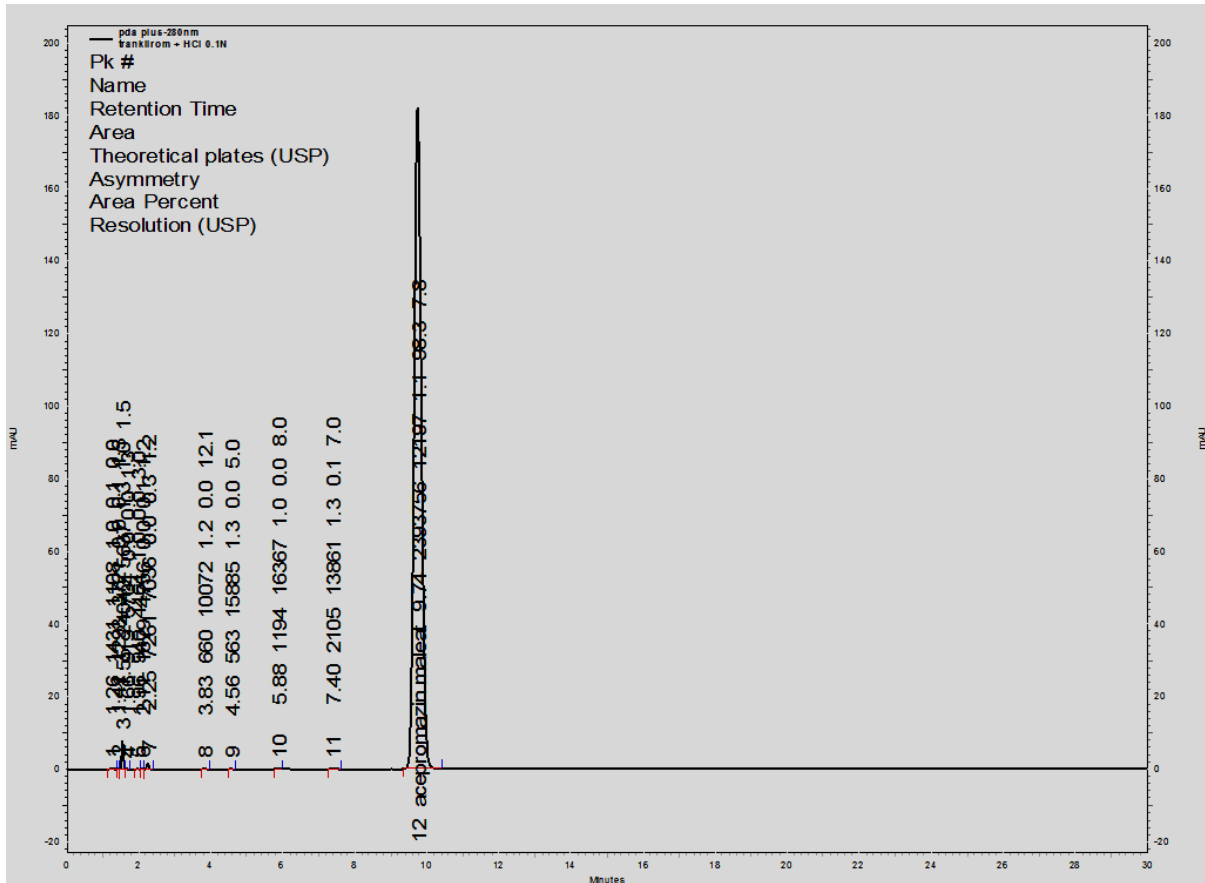


Figura 2. Degradare acidă

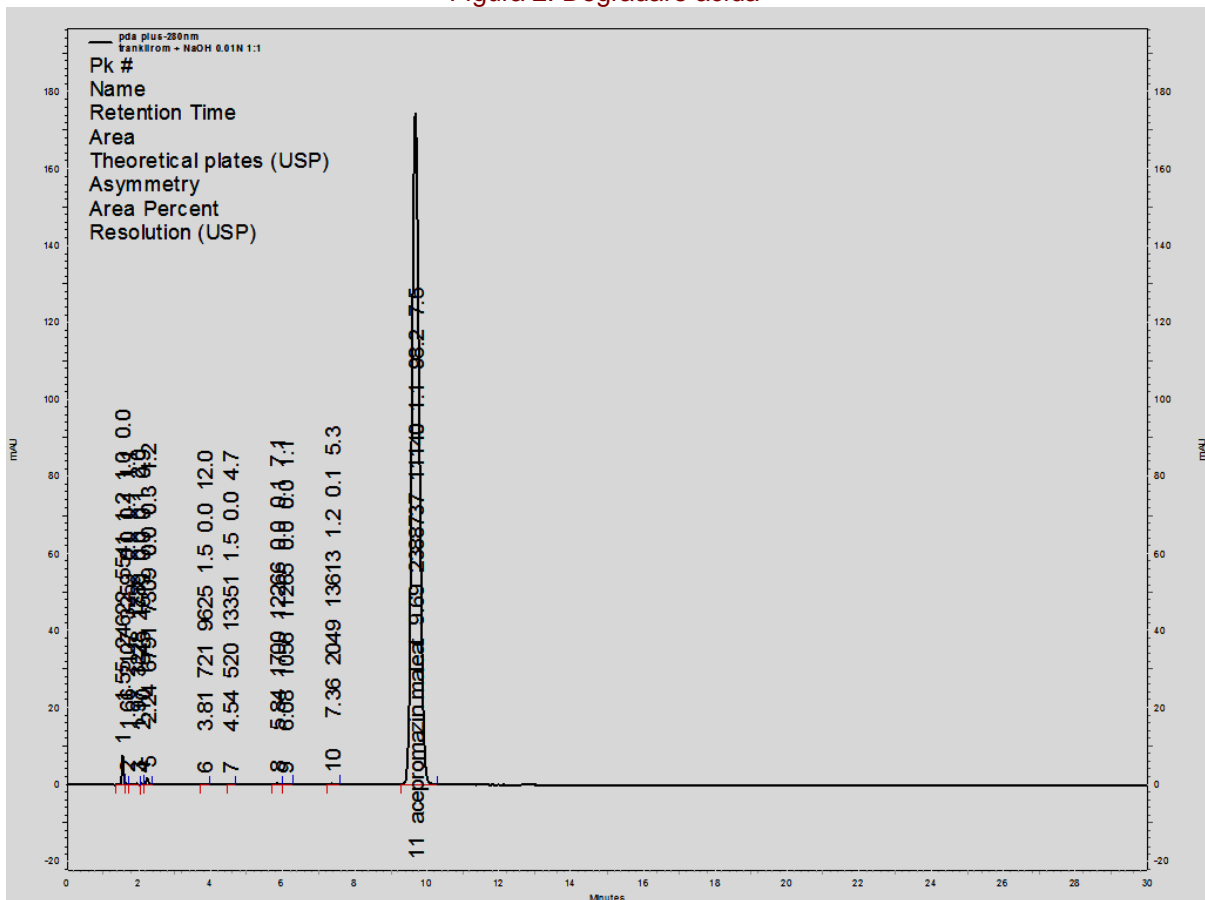


Figura 3. Degradare bazică

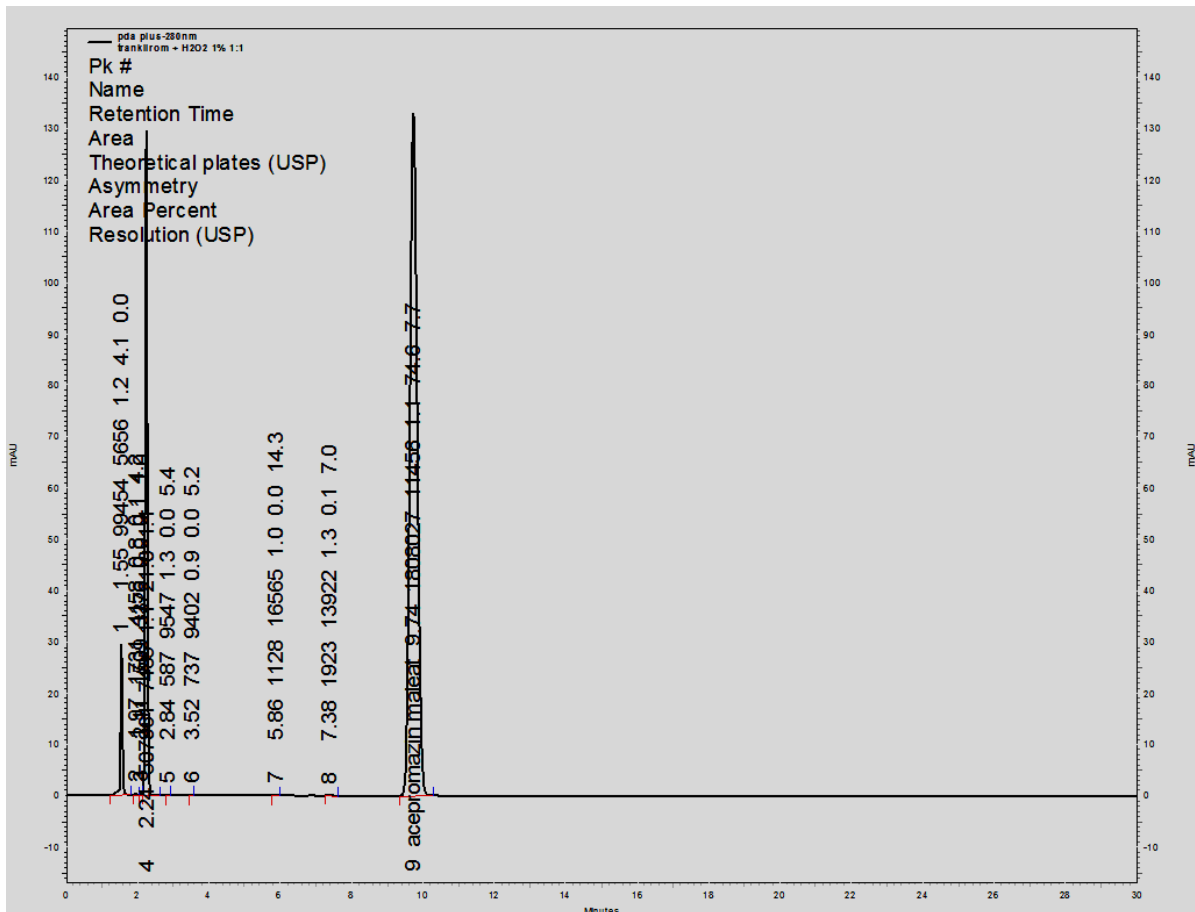


Figura 4. Degradare oxidativă

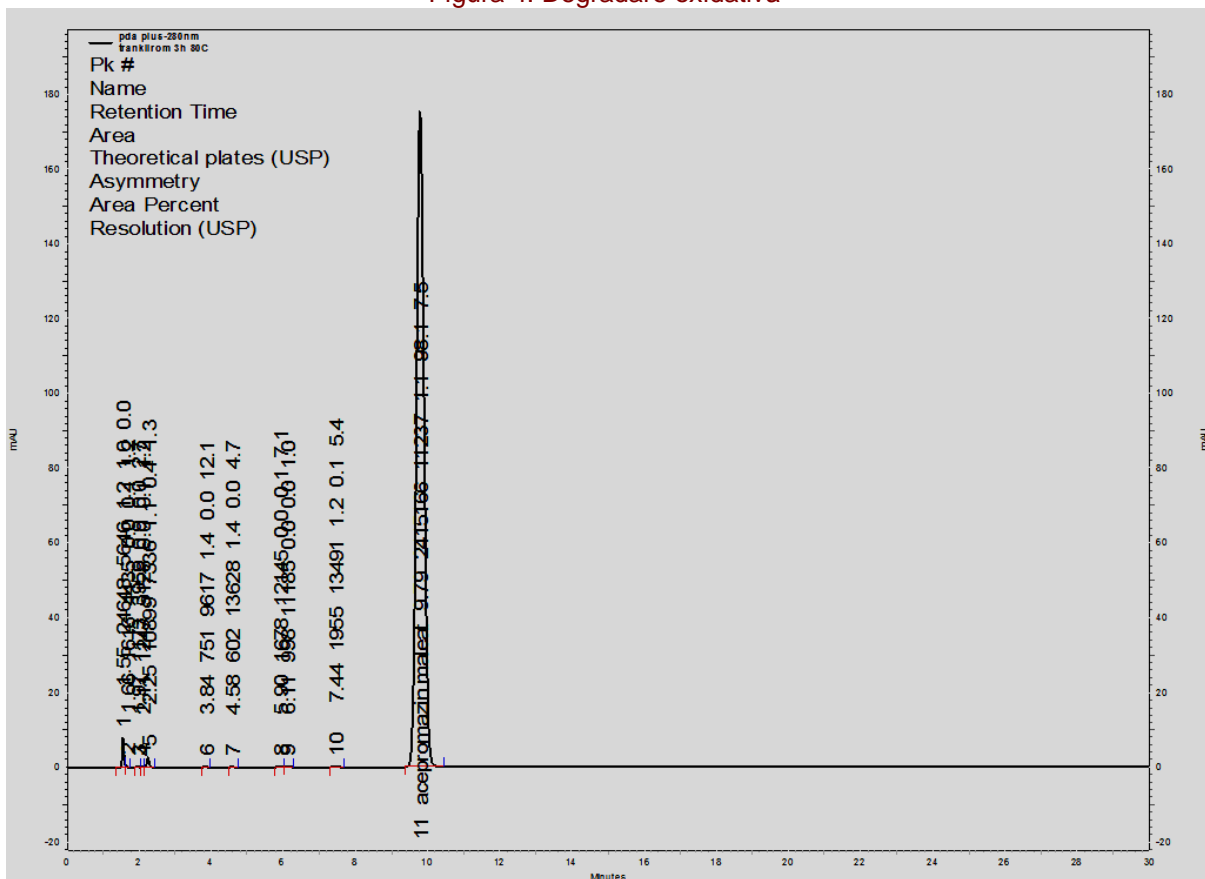


Figura 5. Degradare termică

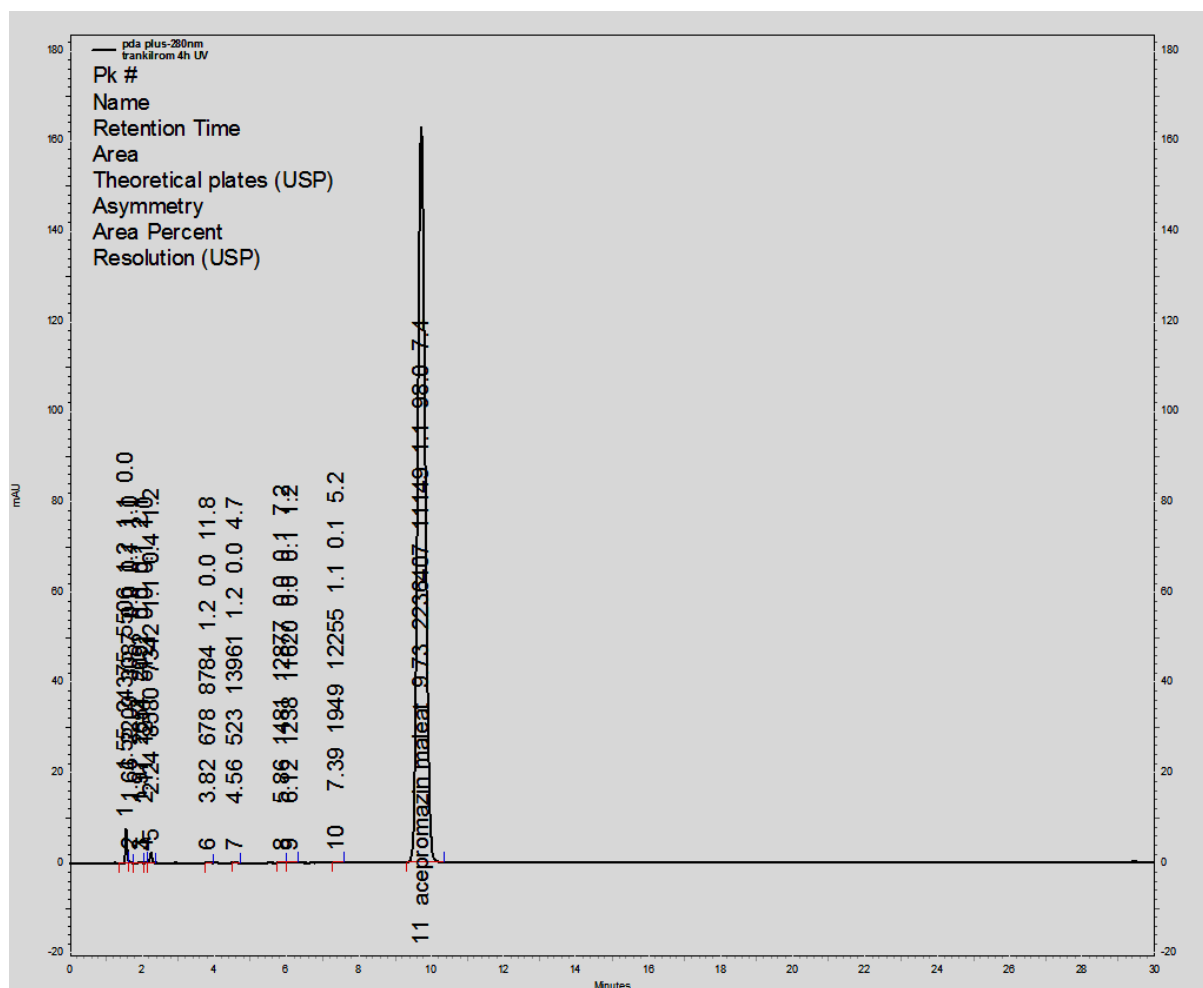


Figura 6. Degradare fotolitică

Concluzii

Testele de stabilitate reprezintă un instrument de analiză important pentru determinarea condițiilor de stocare și conservabilitatea produselor medicinale.

Pe lângă testele de lungă durată efectuate pentru determinarea precisă a perioadei de valabilitate a produselor medicinale, se pot efectua studii accelerate, prin pastrarea produsului la temperatura și umidități excesive. Studiile de degradare forțată reprezintă un model de astfel de studii accelerate de testare a stabilității. Caracterizarea unui compus activ de interes, din punct de vedere chimic și structural face parte din testele de punere la punct a unei noi formule de preparat medicinal.

Studiile de degradare forțată sunt conduse astfel încât să permită realizarea optimă a unui profil de degradare.

Pentru evaluarea stabilității intrinseci și a profilului de degradare compusul chimic de interes este supus unor etape diferite de condiții de mediu accelerate.

Metodele HPLC reprezintă principalul instrument analitic pentru caracterizarea substanței de interes și a impurităților specifice și nespecifice.

În mod curent, aceeași metoda HPLC se poate aplica pentru studiul unei substanțe active și a unui produs medicinal care o conține, adesea, aceeași metoda putând fi utilizată și pentru studiul impurităților.

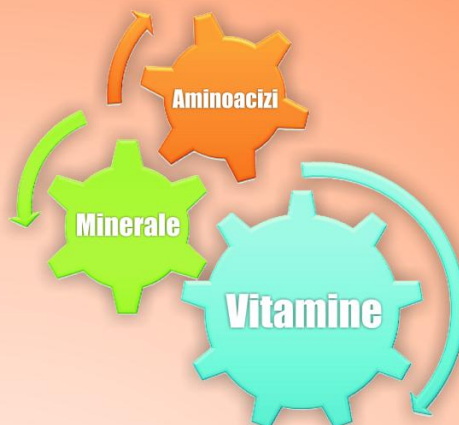
Totuși, determinarea cantitativă și puritatea pot fi realizate prin metode diferite.

Metoda HPLC aleasă trebuie să poată diferenția cu acuratețe și să cuantifice compusul de interes de impuritățile specifice și nespecifice.

Bibliografie

1. **Banker GS, Rhodes CT** (2002). *Modern Pharmaceuticals – Fourth Edition. Rev. and Expanded.* 2002: 152.
2. **Carr GP, Wahlich JC** (1990). A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal*, 86: 613-618.
3. **FDA Guidance for Industry** (2003). INDs for Phase II and III Studies – Chemistry, Manufacturing, and Controls Information.
4. **FDA Guidance for Industry**, Analytical Procedures and Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services FDA, August 2000.
5. **Guideline** for submitting samples and analytical data for methods validation. Food and Drug Administration (1987). US Government Printing Office: 1990-281-794: 20818.
6. **ICH Q1A** (2003). Stability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Drugs For Human Use, Geneva, Switzerland.
7. **ICH Q1B** (1996). Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Drugs For Human Use, Geneva, Switzerland.
8. **ICH Q2 (R1)** (1987). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guideline for submitting samples and analytical data for methods validation. Food and Drug Administration, US Government Printing Office.
9. **ICH Q2 (R1)** Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology
10. **Jenke DR** (1996). Chromatographic method validation: a review of common practices and procedures II. *J. Liq. Chromat.* 19: 737-757.
11. **Kats M** (2005). Forced degradation studies: regulatory considerations and implementation. *Bio. Pharm. Int.*
12. **Reynolds DW, Facchine KL, Mullaney JF, Alsante KM, Hatajik TD, Motto MG** (2002). Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharm Tech* 2002: 48-56.
13. **Szepesi G** (1989). Selection of high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis. *J Chromatogr* 464: 265-278.

NOU!



SOLUȚIE ORALĂ

SELEVIT SOL

COMPLEX DE VITAMINE, MINERALE, AMINOACIZI, SELENIU



**RECOMANDAT
PENTRU:**

- * Lipsa de vitamine/oligoelemente
- * Situații de stres, stări de convalescență
- * Stimularea sistemului imunitar
- * Obținere de parametri superiori de producție
- * Creșterea fertilității
- * Prevenirea/tratamentul atrofiilor musculare



FarmaVet[®]
Fundat 1955

Distribuitor: S.C. Farmavet S.A.
Calea Giulești nr. 333, Sector 6, 060269 București
Office@farmavet.ro
Tel. 021/221.99.60, 021/220.69.09 Fax 021/220.69.32



producător
Pasteur
Filipești
ROMÂNIA

Mic ghid de stabilire a eco-toxicității solului și apelor Small guide establishing eco-toxicity of soil and water

Crina L. Moşneang, Romeo T. Cristina
Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

Cuvinte cheie: soluri, ape, eco-toxicitate, ghid
Key words: soils, waters, eco-toxicity, guide

Rezumat

Ecotoxicitatea solului și a apelor este una din preocupările majore cu implicații deosebite în calitatea viteții omului și animalelor. În consecință, au apărut numeroase metode de stabilire a gradului de poluare a mediului, care în ultimul deceniu, au cunoscut o dezvoltare extraordinară în ultimii ani, cu aplicare în legislațiile europene și naționale. În review-ul de față se dorește familiarizarea cititorilor cu câțiva indicatori de testare a poluării apei și solului; respectiv testarea pe peștii zebra și râme, organisme recunoscute ca indicatori viabili și sensibili ai poluării. Sunt descrise metodologiile de testare cele mai cunoscute: toxicitatea acută și cronică asupra peștilor; determinarea poluării prin utilizarea râmelor (Protocolul OECD 207). În plus, în capitolul Metodologia analitică de stabilire a eco-toxicității solului și apelor este prezentată sintetic gaz- cromatografia cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS) și aplicațiile în stabilirea gradului de poluare a mediului, iar în ultimul capitol, este prezentată Legislația în domeniul managementul deșeurilor cu legislația Europeană și Românească conexasă.

Abstract

Soil and water ecotoxicity is one of the major concerns with important implications for human and animal life's quality. Consequently, there were appeared many methods to determine the level of environmental pollution, which in the last decade have seen a tremendous development, with the implementation of European and national legislations. The present review is intended to familiarize readers with some indicators of water pollution and soil testing; testing that zebra fish and earthworm bodies recognized as viable and sensitive indicators of pollution. It describes the testing methodology known: acute and chronic toxicity on fish; determining pollution by using earthworms (OECD Protocol 207). In addition, analytical methodology chapter establishing eco-toxicity is summarized soil and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and applications in determining the degree of environmental pollution, and the last chapter is presented legislation manure management in the EU and Romanian legislation related.

1. Despre utilizarea indicatorilor moderni de poluare apei și solului

1.1. Peștii zebra

Cercetătorii de la Universitatea din Singapore reprezentați prin Gong și col., au utilizat prin manipulare genetică un tip de **pești zebra** care detectează poluanții din apă prin schimbarea culorii.

De obicei, peștii zebra sunt de culoare neagră și argintie iar prin inginerie genetică s-au obținut varietăți de culoare verde sau roșu fluorescent (Fig.1-2.) [7, 12].

Genele fluorescente sunt extrase din meduze și injectate în icrele peștilor zebra. Cu aceste gene corpul peștilor zebra este capabil să ofere o strălucire fluorescentă (Fig.3).

Activarea acestor gene va funcționa ca un comutator pentru activarea diferitelor țesuturi ale peștilor (Fig.4-5).

Până în prezent, cercetătorii au reușit să izoleze două tipuri de promotori de gene la peștii zebra, un promotor inductibil de estrogen și un promotor receptor de stres.

Acești promotori au fost utilizați pentru a induce genele fluorescente de culoare la peștii zebra transgenici [7].

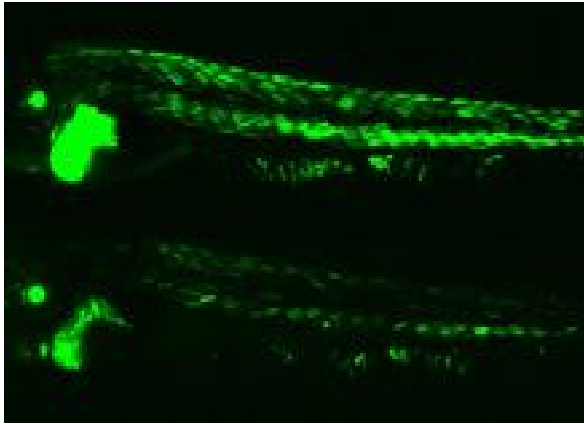


Fig.1. Evidențierea peștilor zebură fluorescenți [37]

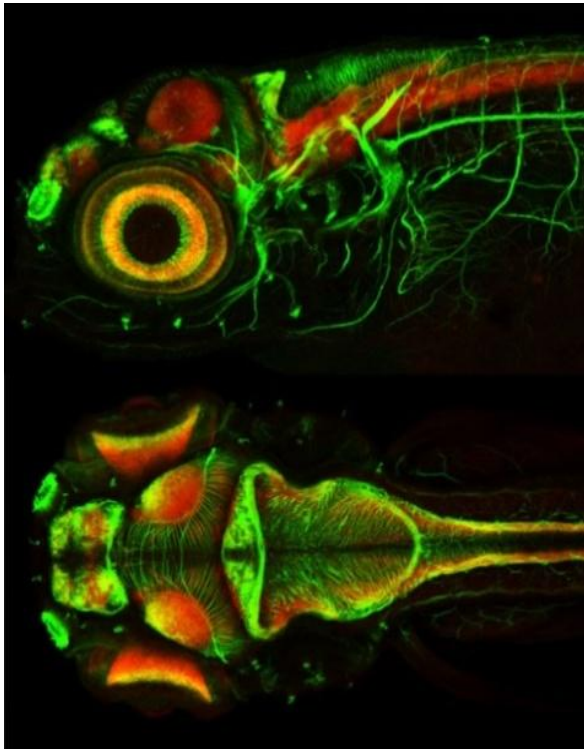


Fig. 2. Neuroanatomia peștilor zebură: axoni (verde) și neuropil (roșu) [45]



Fig. 3. Pești zebură transgenici [37]

Peștii zebură transgenici vor fi capabili să răspundă la prezența substanțelor chimice ca estrogenul prin promotori estrogenici, metale grele și toxine prin promotori receptori de stres.

Peștii își schimbă culoarea dependent de tipul de mediu pentru care a fost specificată culoarea respectivă. Deși s-a conceput doar culoarea roșie și verde a peștilor zebură, Gong a evidențiat faptul că poate adăuga până la cinci culori pe un pește zebură, fiecare culoare indicând un poluant diferit [7, 12, 47].



Fig.4. Embrioni de pești zebură- modificări de culoare ca indicatori de poluare [41]

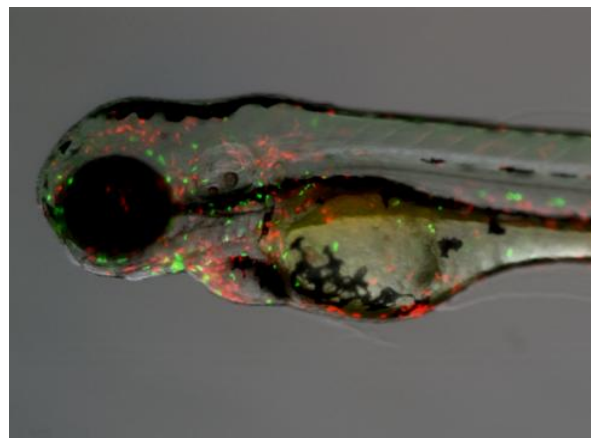


Fig. 5. Embrioni de pești zebură- utilizați în cercetarea bolilor infecțioase la om [40]

1.2. Râmele

Râmele sunt frecvent folosite ca determinanți ai poluării solului [1, 6, 33].

Râmele sunt incluse în încrengătura *Annelida*, clasa *Oligochaeta* (Fig. 6), au un corp aproape cilindric, acoperit cu peri dispuși numai pe părțile laterodorsale și lateroventrale ale segmentelor. În treimea anterioară a corpului se observă o îngroșare

a tegumentului cu aspect de şa, denumit clitellum, cu rol în reproducerea viermilor, secretând un cocon în care sunt depuse ouăle. Formele terestre ale clasei *Oligochaeta* trăiesc în sol, frunzar, humus brut etc., săpându-şi galerii în stratul superficial al solului printre rădăcinile plantelor sau în profunzime.



Fig.6. Aspect macroscopic al reprezentantului clasei *Oligochaeta* [44]

Efectele benefice asupra solului sunt reprezentate de aerarea solului, transportul solului mineral din profunzime spre suprafaţă şi al solului biogen spre profunzime.

O mare parte participă şi la procesele de transformare a resturilor vegetale în humus.

Mediul de viaţă este reprezentat de sol, care odată înghiţit trece prin tubul digestiv, unde substanţele nutritive sunt reţinute iar resturile nedigerate eliminate sub formă de excremente la suprafaţa solului [1, 10, 14].

1.2.1. Etologia şi ecologia râmelor

Râmele nu prezintă organe respiratorii adecvate astfel fiind necesar un contact intim între suprafaţa corporală şi apă pentru a realiza schimburi gazoase. Amoniacul excretat se elimină în prezenţa unei cantităţi crescute de urină hipotonică.

Presiunea hidrostatică a lichidului celomic influenţează mobilitatea şi săparea galeriilor fiind dependente de o cantitate de apă a organismului de peste 18% [13].

Durata de viaţă pentru *Eisenia fetida* este de 4,5 ani iar pentru *Lumbricus terrestris* în jur 6 ani [46].

Lumbricidele pot fi împărţite în trei grupuri morfo-ecologice, specii dependente de modul de hrănire şi de construcţie a galeriilor după cum urmează:

1. Epigeice, trăiesc pe suprafaţa solului, în tăviţele plantelor, în substraturi organice. Sunt organisme de dimensiuni reduse adaptate la condiţiile de umiditate şi temperatură de la suprafaţa solului şi sunt greu adaptabile în straturile de adâncime.

Pe perioada diapauzei sapă galerii temporare în solul mineral. *Eisenia fetida* se utilizează în vermicompostare dispunând de o perioadă scurtă între generaţii.

2. Endogeice, trăiesc în straturile de sol de la suprafaţă şi se hrănesc cu sol şi materie organică. Acestea nu construiesc galerii permanente, canalele temporare se vor umple cu material coprolitic în urma deplasării râmelor şi excreării din intestine.

Galeriile săpate sunt orizontale şi arborescente. Importanţa acestora este în descompunerea rădăcinilor, amestecarea straturilor de sol şi în aerarea solului.

3. Anecice, care construiesc galerii verticale permanente, pătrunzând adânc în sol. Sunt detritivore trăgând hrana în galerii săpate până la câţiva metri în sol.

Dezavantajul este că pot forma dopuri de materie organică sau coprolite (sol excretat şi particule minerale) astfel blocând deschiderea galeriilor. Efectul benefic al acestor specii printre care se află şi *Lumbricus terrestris* este de a descompune materia organică, a realiza circuitul substanţelor nutritive şi de a forma solul [1].

Hrănirea se realizează prin procese de reacţie a materialului de sol coloid, organic şi anorganic neresorbit cu formarea unor complexe argilo-humice [18, 46].

Mecanismul de hrănire se bazează pe triturare şi amestecare în stomacul muscular cu ajutorul grăunţelor de nisip înghiţite, apoi digestia se continuă în intestinul mediu cu participarea enzimelor digestive şi a concreţiunilor de calcar produse de glandele calcaroase urmând apoi resorbţia [10].

În excrementele proaspăt eliminate de râme s-a identificat o cantitate de germeni aproape similară probelor de sol din jur [10].

Conţinutul de humus și calciu, forța de retenție a apei și stabilitatea glomerulelor sunt mai mari în excrementele de râme decât în probele de sol colectate din apropierea canalelor săpate de viermi [10].

Lumbricidele sapă galerii în sol prin contracții coordinative ale benzilor de mușchi circulari și longitudinali din peretele corpului.

Aceste contracții sunt realizabile de către segmentele corpului care sunt menținute turgescențe de către lichidul celomic. Aceste mișcări coordinative permit viermelui să transfere contracția de la un segment la altul cu efect de undă care propulsează organismul spre înainte [46].

Efectele benefice ale lumbricidelor sunt reprezentate de faptul că [10, 36, 38]:

- descompun materia organică moartă și a celei aflate în descompunere cu o nutriție bazată pe bacteriile și ciupercile care se dezvoltă pe aceste substraturi
- reduc incidența bolilor produse de fungi
- fragmentează materia organică, desfășoară activități de forare a galeriilor, amestecă solul și participă la formarea agregatelor structurale de sol
- ajută la creșterea ratei de infiltrare a apei și capacitatea de reținere a apei în sol, îmbunătățesc procesele de aerare din sol
- oferă canale pentru creșterea rădăcinilor plantelor și mărunțesc și îngroapă resturile plantelor

Pe lângă materia organică moartă, lumbricidele ingeră particule de sol de dimensiuni mici amestecând și macerând totul până la particule foarte mici asemenea unei paste fine care apoi va fi digerată în stomac.

Coprolitele proaspete ale lumbricidelor sunt de cinci ori mai bogate în azot accesibil plantelor, de șapte ori în fosfor și de 11 ori mai bogate în potasiu comparativ cu primii centimetri de la suprafața solului. Dacă există o cantitate mare de humus accesibil,

greutatea coprolitelor excretate poate depăși 4,5 kg / lumbricid / an, fiind un indicator al interesului sporit al grădinarilor și fermierilor de a menține populațiile de viermi la un nivel înalt [36].

Cercetările realizate în SUA au evidențiat faptul că lumbricidele conțin substanțe cu proprietăți antiinflamatoare pentru tratarea artritei și a altor patologii ale articulațiilor [46].

1.2.2. Importanța și efecte asupra umidității din sol

Galeriile grăbesc scurgerea apei în și din sol. O rată crescută a infiltrării ajută la prevenirea poluării prin minimalizarea eroziunii de suprafață și transportul chimic spre apele de suprafață [46].

Totodată galeriile favorizează transportul poluanților, nitrați sau pesticide spre pânzele freatice [5].

Galeriile orizontale ale speciilor endogeice nu transportă apa și soluțiile la aceeași adâncime ca și galeriile verticale ale speciilor anecice [46].

2. Metodologii uzuale

2.1. Toxicitatea acută asupra peștilor

Metodologiile conform **Ordinului nr. 245 din 26 martie 2005** sunt [30]:

2.1.1. Caracteristicile principale

- aprecierea toxicității acute letale a substanțelor din apele de suprafață asupra peștilor;
- necesitatea însușirii proprietăților fizico-chimice ale substanțelor de investigat: gradul de solubilitate în apă, presiunea vaporilor, caracterul biodegradabil, stabilitatea substanței, în vederea alegerii unei metode de test adecvate pe sistem static, semi-static sau prin curgere continuă în scopul de a asigura concentrații de substanță neschimbate pe întreaga durată a testului;

- conferirea unor informații legate de formula chimică, puritatea, natura, observarea prezenței și a cantităților de aditivi, valoarea coeficientului de partiție n-octanol / apă, care se vor lua în calcul pentru o bună organizare a testului și pentru a interpreta rezultatele.

2.1.2. Definiții aferente

- **Toxicitate acută** – decelarea efectelor defavorabile într-un timp scurt (96 h) asupra organismelor de test în prezența unei substanțe; care se expune prin concentrația medie letală.

- **CL₅₀** – concentrația care omoară 50 % din peștii care se găsesc în apa de testare într-o perioadă de expunere continuă.

- **Unitățile de măsură:** greutate/ volum (mg/L) ori greutate/ greutate (mg/kg) [30].

2.1.3. Principiul de realizare a metodei

Limita superioară de testare poate fi realizată la 100 mg/L substanță pentru a dovedi că CL₅₀ reprezintă o concentrație ridicată față de această concentrație.

Peștii se expun la substanța de testare în concentrații seriate pe parcursul a 96 h; mortalitățile fiind înregistrate la intervale de minim 24 h iar concentrațiile la care letalitatea peștilor este de 50 % (CL₅₀) sunt luate în vedere și înregistrate [30].

2.1.4. Criteriile de calitate

Lotul de control trebuie să aibă o mortalitate mai mică de 10 % la sfârșitul testului. **Saturația oxigenului dizolvat trebuie să fie mai mare de 60 %.**

Substanțele de testare vor reprezenta circa 80% din concentrația de început pe toată durata testării. Pentru substanțele ușor dizolvabile în mediu sau care sunt stabile, concentrația inițială este apreciată a fi un echivalent al concentrației nominale. Se evidențiază care au fost concentrațiile utilizate pe toată durata testării și care au fost condițiile experimentale. Acestea se

subliniază pentru substanțele care îndeplinesc următoarele caracteristici:

- dețin o solubilitate scăzută în mediul de testare;
- pot forma dispersii și emulsii stabile;
- sunt instabile în soluții apoase,
- concentrația inițială va fi măsurată în soluție la începutul testării.

Concentrația va fi apreciată după o perioadă de stabilizare, dar înaintea introducerii peștilor. Determinările care se realizează pe toată durata testării trebuie să afirme că pH -ul nu diferă cu mai mult de o unitate [30].

2.1.5. Modul de lucru

Metoda de testare poate fi de trei feluri:

- **testul static** – este un test la care soluția de testare nu se schimbă;
- **testul semi-static:** soluțiile de testare sunt reînnoite în mod regulat;
- **testul cu curgere continuă:** apa este reînnoită permanent în acvariile de testare.

Reactivii

Soluția stoc de testare – se prepară printr-o dizolvare a substanței în apă deionizată. Concentrațiile se pregătesc din soluția stoc printr-o diluare seriată; iar în cazul utilizării unor concentrații mari, substanța se poate dizolva nemijlocit în apa de diluție.

Gradul de solubilitate este important în obținerea acestor concentrații. Substanțele se testează până la limita de solubilitate găsită. Substanțele cu solubilitate redusă sau cele care formează o dispersie cu stabilitate, au la bază realizarea unei concentrații regăsite peste limita de solubilitate a substanței de testare cu scopul de a obține o concentrație maximă solubilă sau stabilă.

O dispersie ultrasonică se poate utiliza, pentru substanțele cu o solubilitate scăzută în apă, pentru a prepara soluțiile stoc. Utilizarea unor substanțe auxiliare, implică ca toate concentrațiile de testare să conțină o cantitate egală de substanță auxiliară [24].

Martorii se vor expune la o concentrație identică de substanțe auxiliare de tipul celor utilizate în seriile de testare.

Concentrația substanțelor auxiliare va fi redusă, fără depășirea a 100 mg /L în mediul de testare. Testul se va realiza fără ajustarea pH -ului.

Orice modificare evidentă a valorii pH-ului implică repetarea testului prin folosirea unui pH adaptat și cu înregistrarea rezultatelor.

Astfel, valoarea pH-ului pentru soluția stoc va fi adaptată cu pH-ul apei de diluție.

Astfel sunt preferate substanțele de tipul HCl și NaOH. Se va acționa cu prudență pentru a nu modifica concentrația substanței de testare printr-o ajustare a pH-ului. Se va înregistra orice reacție de precipitare sau chimică rezultată.

Apa utilizată pentru diluție:

Se folosește apa cu caracter potabil, necontaminată cu clor sau metale grele, apa naturală cu valoare calitativă sau cea reconstituită. Duritatea apei trebuie să fie între 10 și 250 mg/L (CaCO_3) și pH-ul să fie cuprins între 6,0 și 8,5 [24].

Aparatura necesară:

- aparatura trebuie să fie în totalitate din material inert chimic;
- un sistem de diluție care va fi automatic;
- un dozator de oxigen;
- un echipament pentru a determina duritatea apei;
- un echipament pentru menținerea adecvată a temperaturii;
- un pH-metru.

Peștii utilizați în testare:

Peștii vor fi într-o stare de sănătate fără anomalii fizice și comportamentale, aleși dependent de criteriile de vârstă, cu o posibilitate de întreținere, sensibilitatea la substanțele chimice va fi relativă, și cu posibilitatea de a compara datele obținute cu cele deja existente la nivel internațional.

Pregătirea materialului pt. experiment:

Peștii vor proveni din același stoc, vor avea aceeași lungime și vârstă și vor fi ținuti un minim de 12 zile în următoarele condiții:

- sistem de recirculare/curgere continuă;
- apa;
- lumina: 12-16 ore iluminat zilnic;
- concentrația oxigenului dizolvat de cel puțin 80 % saturație;
- hrănirea se va face de trei ori pe săptămână, hrănirea lor încetând cu 24 h înainte de începerea testării;
- mortalitatea obținută într-un interval de 48 h de la introducerea peștilor în acvariile de acomodare.

Se vor înregistra mortalitățile și se vor aplica următoarele criterii:

- mortalități peste 10% din populație în șapte zile conduc la eliminarea lotului per ansamblu;
- letalitate cuprinsă între 5-10% din populație conduce la o prelungire a perioadei de acomodare pentru încă șapte zile; iar în cazul în care nu mai sunt înregistrate mortalități, lotul se acceptă, altfel se elimină în întregime.
- letalitate sub 5 % din populație duce la o acceptare a lotului.

Adaptare:

Toți peștii se vor menține în apă la o temperatură constantă pe o durată de șapte zile înainte de a începe testului.

Procedura de testare:

Se va face o testare preliminară pentru a obține date referitoare la șirul de concentrații care trebuie utilizat în testul de bază.

Dacă se folosesc substanțe auxiliare pentru a măsura gradul de solubilitate al substanțelor se realizează o probă martor (control). Dependent de proprietățile fizico-chimice ale substanței de testare se va selecta metoda cea mai adecvată din cele menționate. Peștii se vor expune la acțiunea substanțelor astfel:

- durata va fi de 96 h;
- numărul de pești: minim șapte pentru fiecare concentrație;

- acvariile de o capacitate convenabilă în concordanță cu încărcarea cu animale de test; 1 g/l pentru testele semi-stactice și stactice iar pentru cele cu curgere continuă încărcarea ar putea fi mai mare;
- concentrația de testare: se aleg minim cinci concentrații diferențiate printr-un factor de maxim 2,2, pe un domeniu care să acopere mortalitatea între 0 - 100 %;
- lumina: 12 - 16 h /zi;
- temperatura: dependent de specie, dar +1°C în orice testare;
- concentrația oxigenului dizolvat: minim 60 % saturație a oxigenului;
- hrănire: peștii nu se hrănesc.

Peștii se vor observa după 2 – 4 ore de la introducere și la intervale de cel puțin de 24 ore. Peștii se consideră morți, dacă la atingerea înotătoarei codale nu se înregistrează reacții și nu se observă mișcări respiratorii. Se vor nota peștii morți și se îndepărtează din acvarii.

Se înregistrează anomaliile legate de echilibru, înot, respirație și pigmentație. Se va monitoriza zilnic pH-ul, oxigenul dizolvat și temperatura.

Testul limită:

Prin utilizarea procedurilor descrise se poate stabili o limită de testare de 100 mg/L pentru a demonstra că CL_{50} are o valoare superioară acestei concentrații. Dacă substanța nu permite atingerea unei concentrații de 100 mg/L în apa de testare, limita de test se stabilește pentru o concentrație identică cu solubilitatea substanței.

Pentru testul limită se utilizează același număr de pești (7 -10 pești) – la fel ca pentru testul martor; teoria distribuției binomiale afirmă că în cazul în care se utilizează 10 pești cu mortalitate zero, gradul de încredere va fi de 99,9 % iar CL_{50} va fi mai mare decât concentrația utilizată în testul limită.

Dacă sunt folosiți între 7 și 9 pești, absența mortalității implică un grad de

încredere de minim 99 %, însemnând că CL_{50} va avea o valoare superioară concentrației folosite. Apariția mortalității impune dezvoltarea unui studiu complex. Efectele subletale apărute se înregistrează.

2.1.6. Evaluarea și raportarea

Fiecare perioadă de observație va avea drept corespondent un grafic de mortalitate dependent de perioada de expunere față de logaritmul concentrației. Dacă se poate, se vor estima CL_{50} și limitele de confidență ($p = 0,05$). Dacă panta curbei concentrație / mortalitate depășește gradul de înclinare, pentru a permite calcularea CL_{50} , este suficientă o estimare grafică a valorii [39].

Dacă două concentrații consecutive în raport de 2,2 au valori ale mortalității de 0% și 100 %, aceste valori sunt suficiente pentru a aprecia intervalul în care se situează CL_{50} .

În cazul în care se observă că nu se poate menține o stabilitate și o omogenitate a substanței de testare, se vor nota observațiile și se va ține cont de ele la o viitoare interpretare a rezultatelor.

Raportul trebuie să includă următoarele:

- observații referitoare la organismele de testare – denumire științifică, numărul folosit pentru fiecare concentrație, gen, specie, mărime;
- caracteristicile chimice și sursa pentru apa de diluție (pH-ul, duritatea, temperatura);
- pentru substanțele cu solubilitate redusă în apă, se include metoda de realizare a soluției stoc și a soluțiilor de testare;
- concentrația substanțelor auxiliare;
- lista concentrațiilor utilizate și orice alte date referitoare la stabilitatea concentrațiilor în soluția de testare;
- realizarea analizelor chimice implică redarea metodelor utilizate și a rezultatelor obținute;
- se va înregistra rezultatul testului limită;
- motivația și detaliile procedurii de testare (pe sistem static, semi-static, cu

curgere continuă, doza, viteza de curgere, încărcarea cu organisme de testare, aerarea apei);

- descrierea echipamentului utilizat;
- iluminarea;
- concentrația oxigenului dizolvat, valorile pH și temperatura obținută la fiecare 24 h;
- aprecierea îndeplinirii criteriilor de calitate;
- redarea sub formă tabelară a mortalității cumulative pentru fiecare concentrație și a martorului la timpul de observație recomandat;
- graficul curbei concentrație/ procent răspuns la sfârșitul testării;
- CL_{50} la fiecare timp de observație (limită de confidență 95%);
- procedurile statistice utilizate pt. LC_{50} ;
- concentrația cea mai mare a testării, la care nu se observă mortalitate pe toată durata testării;
- concentrația cea mai mică care provoacă mortalitate 100% pe perioada testării [30].

Alte metodologii de testare se vor descrie în partea de cercetări proprii a tezei.

2.2. Metodologia de determinare a toxicității cronice asupra peștilor

2.2.1. Principiul metodei

Pentru monitorizarea efectelor cronice ale substanțelor cu risc s-a ales metoda de colorare hematoxilină-eozină, fiind o metodă accesibilă, care permite înregistrarea efectelor legate de structura mai multor organe vitale-branhii, intestine subțiri, ficat, rinichi și musculatură [30].

Modul de lucru

Reactivii:

- alcoolul etilic absolut,
- formol,
- acetona,
- benzen,
- hematoxilina,

- eozina,
- albumina,
- parafina.

Aparatura:

- un microtom;
- un termostat cu includere în parafină;
- plită pentru întinderea secțiunilor;
- un microscop;
- un aparat de fotografiat.

Sticlăria utilizată:

- vase de tip Borel,
- lame,
- și lamele [30].

Metodologia de intoxicare:

- peștii din experiment se introduc în acvării cu capacitatea de 30 L;
- se utilizează 20 de organisme/acvariu;
- concentrațiile din testare vor fi subletale;
- concentrațiile alese depind de caracteristicile substanței.

Testele cronice se vor realiza în regim static.

Metoda de prelevare

Peștii intoxicați se vor preleva pentru investigații histopatologice la interval de maximul 30 zile.

Procedura de testare

Recoltarea peștilor pentru testarea histopatologică se face la un interval de 30, 60, 90, 120 și respectiv 150 zile, până la cel mult un an. Obținerea preparatelor histologice impune o recoltare a fragmentelor și o prelucrare a lor după o tehnică de manipulare histopatologică. După disecția anatomică a peștelui se vor preleva fragmente de branhii, ficat, intestin subțire, rinichi, și musculatură, deoarece acestea sunt organe vitale și organe țintă pentru substanțele care se acumulează sau au un efect toxic.

Fixarea

Fragmentele de organe obținute în urma disecției se fixează în formol 10 %, pentru a opri procesele de degradare care apar după moarte.

Deshidratarea și clarificarea

După fixare, piesele se deshidratează în baie de alcool etilic, la concentrații crescătoare (70°, 90°, 100°); iar după deshidratare fragmentele se clarifică în acetonă și benzen. Piesele astfel deshidratate și clarificate se includ în parafină și se mențin la o temperatură constantă de 57°C. Blocurile de parafină, cu fragmente de organe, vor fi secționare la microtom; cu o grosime a secțiunilor de 5 – 6μ.

Colorarea cu hematoxilină eozină

Secțiunile vor fi întinse pe lame cu albumină Mayer și vor fi păstrate la termostat cu includere în parafină timp de 5 - 24 h, la temperatura constantă de 37°C.

Pentru observarea efectelor produse de substanțele investigate este necesar să se realizeze o colorare a secțiunilor și obținerea unor preparate fixe. Astfel lamele cu secțiuni vor fi deparafinate în benzen. Apoi vor fi trecute prin băi succesive de alcool etilic cu concentrații descrescătoare (100°, 90°, 70°), pentru a înlătura solventul parafinei, ultima baie realizându-se cu apă distilată.

Secțiunile se colorează cu hematoxilină și eozină. Acești coloranți evidențiază nucleul și citoplasma. După colorare, secțiunile se deshidratează în alcool etilic cu concentrații crescătoare (70°, 90°, 100°) și apoi clarificate în benzen [30]. Preparatele microscopice sunt montate în balsam de Canada devenind preparate fixe.

2.2.2. Examinarea și raportarea

Se realizează examinarea la microscopul optic și se compară cu martorul. Modificările celulare se descriu detaliat și se fotografiază [30].

2.3. Metode de determinare a poluării prin utilizarea râmelor

2.3.1. Protocolul OECD 207

Protocolul utilizează răspunsul unei singure specii, *Eisenia fetida*, aleasă datorită

caracteristicii de a nu săpa prea adânc în sol și a preferenței acesteia pentru soluri bogate în materie organică, provenită de obicei din resturi vegetale descompuse sau dejecții animale [26].

Testul de toxicitate pe hârtie de filtru

Pentru acest test sunt necesare eprubete de sticlă cu fund plat, de aproximativ 8 cm lungime și 3 cm diametru, care se căptușesc cu hârtie de filtru, tăiată cu dimensiuni potrivite pentru a evita suprapunerea în eprubetă.

Se folosește substanța de testare dizolvată în apă distilată, acetonă, hexan sau cloroform, dependent de solubilitate.

Din soluție se va lua 1 ml și se va introduce în fiecare eprubetă de test iar apoi eprubetele se așează în poziție orizontală în fața unui curent slab de aer pentru ca hârtia de filtru din interior să se usuce.

După uscarea, în fiecare eprubetă se introduce 1 ml soluție de testare respectiv apă distilată în eprubeta martor.

Eprubetele se închid cu dopuri prevăzute cu un orificiu pentru aerare.

Înainte de introducerea râmelor în eprubete, câte una în fiecare eprubetă pentru a nu periclita interpretarea rezultatelor în eventualitatea mortalității acestora, acestea se vor menține trei ore pe hârtie de filtru umedă pentru golirea tubului digestiv, după care se spală și se usucă.

Pe parcursul testului eprubetele se mențin în tăvi într-o poziție orizontală.

Eprubetele se mențin la 20±2 °C, în condiții de întuneric iar mortalitatea se înregistrează după 72 h.

Râmele se consideră moarte dacă nu răspund la stimuli mecanici fin aplicați pe capătul anterior al corpului [10, 43].

Testul de toxicitate pe sol artificial

Substanța de testare se amestecă cu apă distilată care se adaugă peste solul artificial (10% turbă de Sphagnum, 20% argilă caolin și 70% nisip industrial).

Fiecare vas de cultură conţine 750 g sol artificial peste care se pun 10 râme (menţinute în prealabil 24 h într-un alt vas şi spălate). Vasele se acoperă cu folie de plastic perforată care să împiedice evaporarea şi să permită totodată aerarea mediului de testare.

Durata testului este de 14 zile iar în ziua 7 şi 14 se înregistrează datele referitoare la mortalitatea rămelor din testare.

Evaluarea mortalităţii în ziua 7 se face golind conţinutul vaselor de sticlă pe o tavă, se sortează râmele şi li se testează reacţia la stimuli mecanici aplicaţi pe partea anterioară a corpului.

Rezultatele testului cuprind:

- stabilirea biomasei medii vii şi a numărului de râme vii/tratament la începutul şi la sfârşitul testului
- descrierea modificărilor patologice şi etologice (leziuni, ulceraţii ale tegumentului, capacitatea de săpare a galeriilor)
- trasarea grafică a curbei concentraţie/efect
- stabilirea ratei mortalităţii pentru probele martor
- stabilirea ratei mortalităţii pentru probele de testare (descompunerea rapidă post-mortem a rămelor va duce la concluzia că absenţa acestora la momentul numărării semnifică mortalitatea acestora)
- determinarea umidităţii solului artificial la începutul şi sfârşitul testului
- precizarea concentraţiei la care mortalitatea a fost zero
- precizarea concentraţiei la care mortalitatea a fost 100% [10, 43].

3. Metodologia analitică de stabilire a eco-toxicităţii solului şi apelor

3.1. Gaz- cromatografia cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS)

Gaz-cromatografia cuplată cu spectrometria de masă se utilizează pentru

identificarea calitativă şi măsurarea cantitativă a unor componente din amestecuri complexe.

Strategia analizei calitative

Pentru asigurarea identificării calitative a componentelor organice prin GC-MS se vor respecta anumite criterii: spectrul de masă a compușilor cunoscuți sau necunoscuți trebuie să corespundă întregului registru de spectre de masă. Astfel spectrele compușilor autentici vor fi însoțite de o bibliotecă de referință spectrală sau de o mostră a produsului respectiv.

Strategia analizei cantitative

Cuantificarea vizează zona picurilor cromatogramelor de masă sau monitorizarea ionică. Cu ajutorul tehnicii de monitorizare ionică, spectrometrul de masă nu este setat pentru scanarea tuturor maselor, în schimb, instrumentul face salturi de la o masă la alta.

Avantajul este că spectrometrul de masă este reținut o perioadă mai mare la o masă selectată, raportul semnal- zgomot la acea masă se îmbunătățește iar sensibilitatea globală a experimentului crește cu un factor de la 100 la 1000 [35].

3.1.1. Gaz-cromatografia

Procesul de separare cromatografică se desfășoară în coloana cromatografică.

Coloanele în cromatografia de gaze pot fi clasificate în următoarele tipuri:

1) **Coloane umplute**, în care umplutura este reprezentată de către faza staționară depusă pe un suport inert iar materialul astfel rezultat este introdus mecanic într-o coloană (metalică sau silice topită, cu diametrul de ordinul mm și lungimea de până la 1 m).

2) **Coloane capilare (WCOT – „wall coated open tubular”)** având pe peretele interior un film lichid imobilizat, cu grosime de strat între 0,1 și 5 μm (de regulă 0,25 μm). Coloanele capilare sunt construite din silice topită sau borosilicat, acoperite la

exterior dintr-un strat protector de polimer.

Lungimea acestora este de până la 100 m, iar diametrul interior între 0,05 – 1 mm. Eficiența acestora este foarte mare, separările cromatografice pe astfel de coloane atingând 5.000-10.000 talere/m lungime de coloană.

3) Coloane capilare (SCOT – „support-coated open tubular”) având pe peretele interior depus un strat cu grosimea de cel mult 30 μm , alcătuit din particule ale unui suport inert (de exemplu, pământ diatomeic) pe care este depusă faza staționară propriu-zisă dată de un film lichid cu grosimea de maximum 1 μm (Fig. 7) [16].

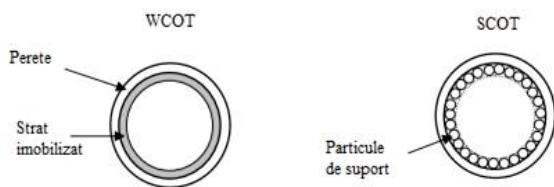


Fig.7. Imagini pe secțiune WCOT și SCOT [16]

Gaz-cromatografia cuplată cu spectrometria de masă poate fi utilizată pentru analiza componentelor volatile care sunt stabile la temperaturi ridicate de separare.

Hong și col. (2001) a utilizat GC-MS, cromatografia prin excluderea mărimii SEC, cromatografia de extracție în fază solidă SPE pentru măsurarea a 18 pesticide din praf [9].

Pesticidele volatile din plante și sol s-au analizat prin microextracție de fază solidă [2]. Diferențe considerabile s-au observat între capacitățile de adsorbție a fibrelor, adsorbția pesticidelor fiind mai mare pe polidimetilsiloxan comparativ cu fibrele de poliacrilat [4].

Realizarea cuplajului GC-MS are la bază faptul că substanța organică este deja în fază gazoasă.

Dacă se utilizează coloanele cu umplutură, debitul de gaz purtător este în jur de 20÷30 cm^3/min , cu efecte asupra valorii presiunii din spectrometru (1 cm^3 de gaz aflat

la presiune atmosferică ocupă un volum de 10⁷ cm^3 la presiunea de 10⁻⁴ mm Hg; astfel că pompa de vid trebuie să asigure un debit de evacuare de 150 l/s pentru a îndepărta 1 cm^3 de gaz purtător).

Pentru îndepărtarea unui volum crescut din gazul purtător se utilizează mai multe tipuri de interfețe, bazându-se pe viteza superioară de difuzie a eluentului (de obicei heliu) comparativ cu moleculele probei (Fig.8.).

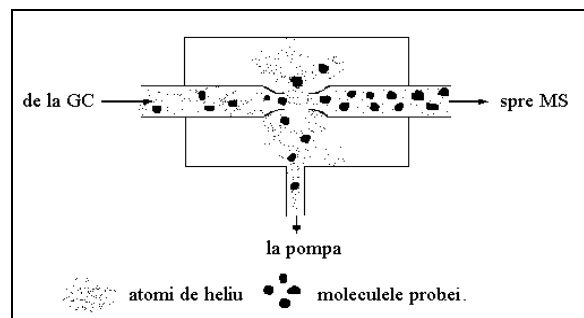


Fig.8. Interfață gaz-cromatograf cuplat cu spectrometrie de masă de tip jet [16]

Efluentul provenit de la gaz-cromatograf este ejectat, printr-un orificiu într-o cameră vidată; din jetul astfel format are loc difuzia preferențială a moleculelor gazului purtător, mai ușoare decât moleculele probei.

Un al doilea orificiu, coaxial cu primul și aflat la o distanță de circa 1 mm de acesta, face legătura cu spectrometrul de masă: aproximativ 90 % din heliu și 40 % din probă nu trec prin al doilea orificiu, astfel încât în aparat ajunge o probă îmbogățită.

Coloanele cromatografice capilare pot fi racordate direct la spectrometrul de masă deoarece debitele la ieșire au valori de numai 1÷5 cm^3/min [16].

3.1.2. Spectrometria de masă

Spectrometria de masă este o metodă instrumentală de analiză a compușilor organici având la bază fragmentarea moleculelor în ioni de masă diferită cu sarcină pozitivă și separarea lor în fascicule de ioni cu aceeași masă folosind

concomitent interacțiunea acestora cu un câmp electric și magnetic.

În principiu, are loc bombardarea substanței de cercetat cu un fascicul de electroni, urmată de accelerarea ionilor formați și separarea lor în funcție de masă prin acțiunea concomitentă a unui câmp electric și magnetic [16].

Un spectrometru de masă cuprinde:

- un compartiment de producere a ionilor sub acțiunea unui fascicul de electroni (1);
- un compartiment de accelerare a ionilor în câmp electric longitudinal (2);
- un compartiment de separare în câmp magnetic transversal funcție de raportul m/e (3);
- un compartiment de detectare a ionilor (4).

Când detectorul (4) este o placă fotografică, care este impresionată mai mult sau mai puțin funcție de numărul ionilor, aparatul se numește spectrograf.

Aparatele moderne înregistrează curentul ionic (proporțional cu numărul de ioni) sub formă de spectru, în funcție de masa ionilor și de abundența lor; asemenea aparate se numesc spectrometre de masă.

Majoritatea spectrometrelor de masă realizează separarea ionilor pozitivi, deoarece la bombardarea moleculelor de cercetat (cel mai adesea organice) cu un fascicul de electroni se expulzează un electron din moleculă formându-se un ion pozitiv.

Diferența esențială a spectrometriei de masă de celelalte metode spectrale constă în aceea că după înregistrarea spectrului substanței cercetate, aceasta nu mai poate fi recuperată, fiind transformată în ioni, pe când în celelalte metode au loc numai modificări în starea fizică a substanței [3, 16].

Schema unui spectrometru de masă cu focalizare magnetică este redată mai jos (Fig.9):

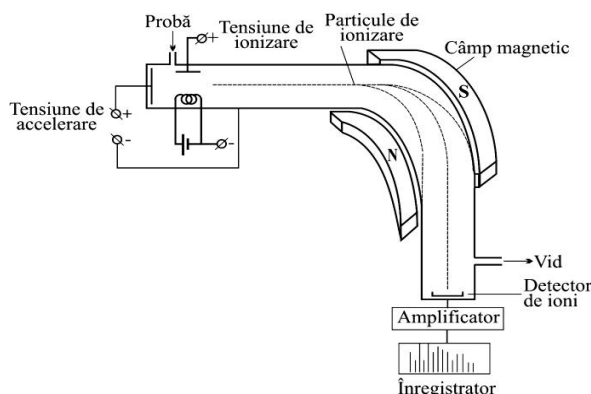


Fig.9. Schema unui spectrometru de masă [16]

- Proba este introdusă în spectrometru și vaporizată;
- Ionii de sarcină z (un multiplu al sarcinii electronului) sunt produși prin bombardarea probei cu un flux de electroni în camera de ionizare; energia electronilor trebuie să fie mai mare de 70 eV ($1 \text{ eV} = 96,5 \text{ KJ.mol}^{-1}$; $70 \text{ eV} = 6750 \text{ KJ.mol}^{-1}$);
- Ionii rezultați sunt accelerați într-un câmp electric căpătând o energie cinetică similară câmpului;
- Ionii de masă m sunt deviați în câmp magnetic funcție de raportul m/z pe diferite traiectorii circulare;
- Variind tăria câmpului magnetic se pot focaliza pe detector ionii de o anumită masă m (m/z);
- Ionii focalizați sunt detectați și se înregistrează spectrul de masă.
- Spațiul interior al spectrometrului de masă este puternic vidat.

Fiecărui raport m/z îi corespunde o traiectorie de o anumită rază:

$$r^2 = \frac{m}{e} \cdot \frac{2U_A}{H^2} \quad (\text{ec.1})$$

În câmp electric energia de accelerare este egală cu energia cinetică:

$$e \cdot U_A = \frac{mv^2}{2} \quad (\text{ec.2})$$

unde:

- m - masa (Kg);
- e - sarcina ionului;
- v - viteza ionului (m/s);
- U_A - tensiunea de accelerare (V).

În câmp magnetic forța magnetodinamică este egală cu forța centrifugă:

$$H \cdot e \cdot v = \frac{mv^2}{r} \quad (\text{ec. 3}) \text{ sau } H \cdot e = \frac{mv}{r} \quad (\text{ec. 4})$$

unde:

H - intensitatea câmpului magnetic (T - tesla);
r - raza traiectoriei ionului (m).

Rezultă că viteza are expresia:

$$v = \frac{H \cdot e \cdot r}{m} \quad (\text{ec. 5})$$

Înlocuind în relația (1) valoarea lui v din expresia (5) obținem:

$$e \cdot U_A = \frac{m \cdot H^2 \cdot e^2 \cdot r^2}{2 \cdot m^2} \quad (\text{ec.6}) \text{ sau}$$

$$2 \cdot m \cdot U_A = H^2 \cdot e \cdot r^2 \quad (\text{ec. 7})$$

de unde rezultă că:

$$r^2 = \frac{m}{e} \cdot \frac{2U_A}{H^2} \quad (\text{ec.8}) \text{ și } \frac{m}{e} = r^2 \cdot \frac{H^2}{2 \cdot U_A} \quad (\text{ec. 9})$$

$$\text{sau } \frac{m}{z} = \frac{r^2 \cdot H^2}{2 \cdot U_A} \quad (\text{ec.10})$$

Spectrul de masă: ionii rezultați prin bombardarea compusului organic sunt instabili și se fragmentează aproape instantaneu.

Spectrul de masă al unui compus organic constituie reprezentarea abundenței relative a fragmentelor de scindare, purtătoare de sarcini pozitive, în funcție de raportul m/e al acestor particule [8].

Drept etalon al abundenței se consideră, de regulă, cel mai intens maxim din spectru - picul de bază - base peak.

Atribuind acestuia valoarea 100% se pot determina cu ușurință abundențele relative ale tuturor ionilor. Întrucât abundențele sunt foarte diferite ca valoare, uneori picurile cele mai importante prezintă în spectru intensități extrem de mici (abundențe foarte reduse).

De regulă, spectrul de masă se dă sub formă grafică. În cazul analizelor cantitative, se înregistrează cantitatea totală de ioni (curentul ionic total); înălțimea unui pic redă ponderea procentuală a celui maxim din cantitatea totală a ionilor.

În acest caz se impune o însumare riguroasă a intensităților tuturor ionilor din spectru până la M (masa moleculară) [17].

3.2. Aplicații

Spectrometria de masă se poate folosi atât în analiza calitativă cât și în cea cantitativă. Spectrometrele de masă se folosesc cuplate cu un gaz cromatograf pentru detectarea și înregistrarea componentelor separate prin gaz cromatografie.

Tehnica mixtă gaz – cromatografie pe coloane capilare - spectrometrie de masă (GC-MSD) cât și cromatografia de lichide de înaltă performanță cu detector spectrometru de masă a putut fi realizată practic datorită faptului că metodele necesită cantități mici de probă și de același ordin de mărime (de la miligrame la nanograme).

Spectrometria de masă folosește și la determinări de mase moleculare și structuri ale substanțelor organice necunoscute prin:

- furnizarea masei moleculare exacte;
- posibilitatea stabilirii unei formule brute;
- prin aducerea unei dovezi asupra existenței posibile a unor element structural caracteristice (alături de alte metode: RMN, IR etc.) [16].

Procesul de ionizare a unei molecule poate avea loc în două moduri:

- cu formare de ioni negativi prin înglobarea electronului (mai rar):



fenomen cunoscut sub numele de "absorbție de rezonanță", cu formarea unui ion pozitiv (cel mai frecvent) prin expulzarea unui electron din moleculă:



Dacă energia electronilor este mică (5 - 10 eV), se formează așa numitul "ion molecular" având aceeași masă ca a moleculei. Ionul molecular format este destul de instabil și se descompune rapid desfăcându-se într-un număr mare de fragmente, de regulă cu formarea unui radical și a unui ion [16]:

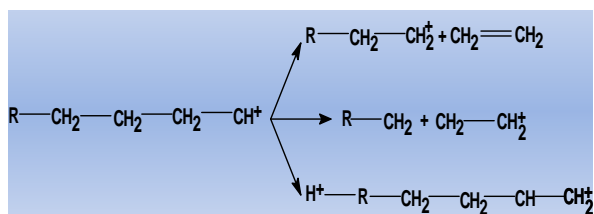


Radicalul fiind neutru din punct de vedere electric nu va fi observat cu spectrometrul de masă. Procesul poate avea loc în mai multe etape. Fragmentările moleculelor în spectrometrul de masă răspund la următoarele trei tendințe:

- formarea de ioni cât mai stabili;
- formarea de radicali cât mai stabili;
- eliminarea de particule neutre stabile (N_2 , CO_2 , H_2O etc.).
- Dintre picurile unui spectru prezintă interes deosebit:
- picul molecular;
- picul de bază care reprezintă etalonul de măsurare a intensității;
- picurile datorate contribuțiilor izotopice.

De exemplu, în cazul hidrocarburilor saturate: ionii moleculari sunt instabili și prin pierderea unui ion de hidrogen se formează ioni de carboniu primari cu formula generală:

$[C_nH_{2n+1}]^+$ O reacție importantă de scindare a acestora este pierderea unei molecule de etilenă, dar se pot scinda radicali liberi alchil sau atomi de hidrogen [8, 11].



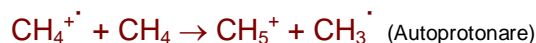
Ionii cu sarcină electrică se stabilizează prin mezomerie iar ionii carboniu trec în ioni mai stabili. Ionizarea moleculelor de analizat se poate face folosind ca reactiv un gaz (metan, metilpropan sau amoniac) care introduși în camera de ionizare, în urma

bombardării cu electroni, produc ioni moleculari, care, reacționează apoi cu moleculele probei cu apariția ionilor de tip MH^+ ; au loc reacțiile:

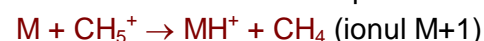
Reacția primară:



Reacțiile secundare:



Coliziune cu molecula din proba M:



Dacă M este de tipul RH : $RH + CH_5^+ \rightarrow R^+ + CH_4 + H_2$ (ionul M-1)

Astfel de ionizare se numește *ionizare chimică (IC)*. În spectrul de masă obținut prin ionizare chimică predomină picul ionului molecular. Avantajul acestui tip de ionizare este creșterea sensibilității detecției la valori de ordinul femtogramelor (10^{-15} g) [74,129].

4. Legislația în domeniul managementul dejecțiilor

4.1. Legislația Europeană

Conform **Directivei nr. 676/ 12 decembrie 1991** privind protecția apelor împotriva poluării cu nitrați proveniți din surse agricole în timpul primului program de acțiune pe patru ani și la sfârșitul acestui program, statele membre pot fixa cantități diferite de cele indicate.

Aceste cantități trebuie determinate astfel încât să nu compromită realizarea obiectivelor prevăzute și trebuie să se justifice prin criterii obiective precum:

- perioadele lungi de vegetație;
- culturi cu o puternică absorbție de azot;
- precipitații nete ridicate în zona vulnerabilă;
- soluri cu capacitate de denitrificare foarte ridicată [21].

Directiva nr. 278/ 12 iunie 1986 CEE (Tabelul 1.) privind protecția mediului, în special a solului, atunci când se utilizează nămoluri de epurare în agricultură, stabilește [19]:

Tabelul 1.

Valorile limită pentru concentrațiile de metale grele în sol [19]

Parametri	Valori limită (mg/kg)
Cadmium	1-3
Cupru	50-140
Nichel	30-75
Plumb	50-300
Zinc	150-300
Mercur	1-1,5

Directiva nr. 83/ 3 noiembrie 1998 CE privind calitatea apei destinate consumului uman stabilește următoarele (Tabelul 2):

Tabelul 2.

Aprecierea parametrilor chimici din apă [22]

Parametri chimici	Parametri valorici	Unitatea
Cadmium	5	µg/l
Cupru	2	mg/L
Nichel	20	µg/l
Plumb	10	µg/l
Mercur	1	mg/L
Crom	50	µg/l

Conform anexei 1 a **Directivei nr. 63 din 22 septembrie 2010** privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, peștii zebră sunt incluși pe lista animalelor de experiment [20].

4.2. Legislația Românească

Nivelul maxim de azotați conform **Legii 458/2002** este de 50 ppm și 0,5 ppm azotiți, depășirea acestor valori fiind periculoase pentru oameni și mai ales pentru copii. Nivelurile toxice de azotați la animale sunt cuprinse între: 133-220 ppm, fiind riscante dacă se utilizează o perioadă îndelungată; 661-880 ppm- crește posibilitatea pierderilor fiind niște limite nesigure; iar peste 880 ppm nu se recomandă utilizarea, putând determina intoxicații acute [25].

Ordonanța de Urgență nr. 195/2005 privind protecția mediului face referire la

faptul că protecția apelor de suprafață și subterane și a ecosistemelor acvatice are ca obiect menținerea și îmbunătățirea calității și productivității biologice a acestora, în scopul evitării unor efecte negative asupra mediului și sănătății umane [32].

Conform **Ordinului nr. 296/ 11 aprilie 2005** și **Ordinului nr. 216/ 13 aprilie 2005** privind aprobarea Programului cadru de acțiune tehnic pentru elaborarea programelor de acțiune în zone vulnerabile la poluarea cu nitrați din surse agricole, pentru fiecare parcelă fertilizată trebuie precizate localizarea (identificarea) suprafeței, data aplicării îngrășămintelor, cultura care a fost fertilizată și cantitatea totală de azot împrăștiat, furnizat de dejecțiile animaliere utilizate ca îngrășămintă organice naturale [31].

Normele de calitate a apei potabile și câteva aspecte comparative importante sunt prezentate în Tabelul 3.

Legislația pentru zonele vulnerabile la poluarea cu nitrați fixează o limită pentru încărcările cu îngrășământ organic (azot), astfel **250 kg/ha de azot total pe fânețe** și **210 kg/ha de azot total pe terenurile arabile**, acestea reprezentând valori medii pentru întreg terenul agricol încadrat ca zonă vulnerabilă la poluarea cu nitrați.

Este necesar a se avea în vedere că limita de încărcare pentru terenurile arabile scade la 170 kg/ha după primii patru ani de aplicare a planului de acțiune.

Pe solurile nisipoase sau cu un profil scurt, programul de acțiune pentru zone vulnerabile la poluarea cu nitrați impune, în funcție de tipul de cultură, condițiile hidrometeorologice și vulnerabilitatea naturală a zonei, o perioadă închisă maximă (1 august- 1 februarie) și o perioadă minimă (1 august- 1 noiembrie), în care nici un fel de îngrășământ organic, cum ar fi bălegarul animalier de consistență solidă, semilichidă sau lichidă, nu poate fi aplicat pe terenurile care nu sunt fânețe sau nu sunt semănate cu culturi de toamnă și nici dacă solurile sunt nisipoase ori cu un profil scurt.

Tabelul 3.

Normele de calitate a apei potabile- aspecte comparative [15, 34]

Nr. crt.	Parametrul	Unitate de măsură	Directiva CEE	Norme Organizația Mondială a Sănătății
1	Turbiditate	mg/L	10	
2	Temperatura	°C	25	
3	pH		6,5-8,5	6,5-8,5
4	Conductivitate	µS/cm	400	
5	Cloruri	mg/L	25	250
6	Sulfați	mg/L	250	400
7	Calciu	mg/L		
8	Magneziu	mg/L	50	
9	Sodiu	mg/L	150	200
10	Potasiu	mg/L	12	
11	Aluminiu	mg/L	0,2	0,2
12	Oxigen dizolvat	% saturație	Saturație >75% exceptând apele subterane	
13	Nitrați	mg/L	50	44
14	Nitriți	mg/L	0,1	
15	H ₂ S	µg/l	Organoleptic nedetectabil	Organoleptic nedetectabil
16	Hydrocarburi dizolvate	µg/l	10	
17	Fenoli	µg/l	0,5	
18	Fier	µg/l	200	300
19	Mangan	µg/l	50	100
20	Cupru	µg/l		1000
21	Zinc	µg/l		5000
22	Fosfați	mg/L	5000	
23	Fluor	µg/l		1500
24	Argint	µg/l	10	
25	Arsen	µg/l	50	50
26	Cadmiu	µg/l	5	5
27	Cianuri	µg/l	50	100
28	Crom	µg/l	50	50
29	Mercur	µg/l	1	1
30	Nichel	µg/l	50	50
31	Plumb	µg/l	50	50
32	Stibiu	µg/l	10	
33	Seleniu	µg/l	10	10
34	Pesticide totale	µg/l	0,5	
35	Benzen	µg/l		10
36	CCl ₄	µg/l		3
37	Clordan	µg/l		0,3
38	Clorbenzen	µg/l		0,1-3
39	Cloroform	µg/l		30
40	2,4 D	µg/l		100
41	DDT	µg/l		1
42	1,2-diclorețan	µg/l		10
43	1,2-dicloretenă	µg/l		0,3
44	Heptaclor și heptaclorepoș	µg/l		0,1
45	Hexaclorbenzen	µg/l		0,01
46	Gamma HCH (lindan)	µg/l		3
47	Metoxiclor	µg/l		30
48	Pentaclofenol	µg/l		10
49	Tetracloretenă	µg/l		10
50	Tricloretenă	µg/l		30
51	2,4,6- Triclorfenol	µg/l		10

Perioada închisă maximă pentru terenurile aflate sub fânețe sau culturi de toamnă este de la 1 septembrie la 1 februarie iar perioada minimă, de la 15 septembrie la 15 noiembrie.

Aceste perioade minime și maxime pot fi modificate în funcție de condițiile locale, la recomandările specialiștilor din cadrul **Sistemului național de monitoring integrat al solului, de supraveghere, control și decizii pentru reducerea aportului de poluanți proveniți din surse agricole și de management al reziduurilor organice provenite din zootehnie în zone vulnerabile și potențial vulnerabile la poluarea cu nitrați**, înființat prin **Ordinul ministrului mediului și gospodăririi apelor și al ministrului agriculturii, pădurilor și dezvoltării rurale nr. 242/197/2005** [27].

Prevederile, conform **Hotărârii de Guvern nr. 964/ 13 octombrie 2000** privind aprobarea Planului de acțiune pentru protecția apelor împotriva poluării cu nitrați proveniți din surse agricole, care duc la reducerea poluării cu nitrați, la raționalizarea și optimizarea utilizării îngrășămintelor ce conțin compuși ai azotului, luând în considerare condițiile din diferite regiuni ale țării trebuie să acopere următoarele probleme [23]:

- Perioadele nepotrivite pentru aplicarea pe teren a îngrășămintelor;
- Modul de aplicare a îngrășămintelor pe terenuri în pante abrupte;
- Restricțiile la aplicarea îngrășămintelor pe terenuri saturate de apă, inundate, înghețate sau acoperite cu zăpadă;
- Condițiile de aplicare a îngrășămintelor pe terenurile amplasate lângă cursurile de apă;
- Volumul și construcția bazinelor de depozitare a deșeurilor de origine animală cât și normele de prevenire a poluării apelor prin infiltrările de la suprafață, a celor apărute în apele subterane și de suprafață a efluenților

rezultați în urma stocării materiilor de origine vegetală și animală [23];

- Aplicarea îngrășămintelor de origine animală și a celor chimice trebuie să se realizeze astfel încât pierderile de nutrienți să fie menținute la niveluri acceptabile (nitrații din apele subterane și de suprafață să fie în limitele admise);
- Managementul terenurilor, rotația culturilor și raportul dintre suprafețele utilizate pentru culturi permanente dependent de terenurile cultivate cu plante anuale;
- Păstrarea pe terenuri a unor suprafețe minime de verdeață care să acopere solul pe perioada cu umiditate maximă, pentru a reține azotul în sol, factor cauzator al poluării cu nitrați a apelor;
- Fertilizarea se va face planificat dependent de tipul de cultură și de înregistrările asupra utilizării îngrășămintelor;
- Apa provenită din șiroire se va proteja împotriva poluării, înainte de infiltrarea apei la rădăcinile vegetației;
- Livrarea se va face exclusiv în vrac, prin utilizarea sacilor de polietilenă, impermeabili, etichetați corespunzător pe care se va menționa tipul de îngrășământ, concentrația și compoziția, solubilitatea, specificațiile pentru depozitare și transport, adresa și numele producătorului etc.);
- Normele privind depozitarea, păstrarea și construcția depozitelor;
- Interdicții în timpul transportului, livrării, depozitării, manipulării și aplicării pe teren;
- Modalități de combinare cu îngrășămintele organice în vederea aplicării pe teren, conform **Hotărârii de Guvern nr. 964/ 13 octombrie 2000** [23].

Măsurile conțin reguli referitoare la: perioadele în care aplicarea anumitor îngrășămintele este nerecomandată sau

interzisă, capacitatea rezervoarelor de stocare a îngrășămintelor de origine animală, această capacitate trebuind să depășească necesarul de stocare în toate zonele vulnerabile, ținându-se seama de restricțiile legate de aplicarea îngrășămintelor pe sol exceptând cazul în care se demonstrează autorității că un exces de îngrășămintă peste capacitatea de stocare va fi supus unui tratament care nu afectează mediul, reducerea aplicării pe sol a îngrășămintelor dependent de caracteristicile zonelor vulnerabile, conform **Hotărârii de Guvern nr. 964/ 13 octombrie 2000 [23]**.

- a) panta de înclinare a solului, condițiile de mediu, clasificarea și caracteristicile terenurilor etc.;
- b) modalitățile de folosire a terenurilor în practicile agricole, inclusiv rotația culturilor.

Aplicarea pe sol a îngrășămintelor are la bază un echilibru între:

- i) evaluarea cantității necesare de azot din culturi;
- ii) aportul de azot din îngrășămintă și sol regăsit în culturi, care trebuie motivat prin:
 - nivelul de azot prezent în sol dependent de necesarul culturii;
 - nivelul de azot obținut prin mineralizare a rezervelor de azot sub formă organică în sol;
 - nivelul de constituenți ai azotului prin administrarea pe sol a îngrășămintelor animale;
 - nivelul de constituenți ai azotului prin administrarea de îngrășămintă de diferite tipuri printre care și chimice.

Ordinul nr. 241/26 martie 2005 și **Ordinul nr. 196/7 aprilie 2005** pentru aprobarea Listei localităților pe județe unde există surse de nitrați din activități agricole și a Listei localităților din bazinele/spațiile hidrografice unde există surse de nitrați din activități agricole (zone vulnerabile și potențial vulnerabile) indică la nivelul județului Timiș, de exemplu zonele [29]:

- Cenei,
- Foeni,
- Gătaia,
- Giarmata,
- Giulvăz,
- Jebel,
- Peciu Nou,
- Periam,
- Șag,
- Satchinez,
- Tormac,
- Uivar,
- Mașloc,
- Pișchia.

Conform **Ordinului nr. 245 din 26/03/2005** pentru aprobarea Metodologiei de evaluare a riscului substanțelor periculoase din listele I și II și al substanțelor prioritare/prioritar periculoase în mediul acvatic prin modelare matematică și a *Metodologiei de evaluare a impactului substanțelor periculoase din listele I și II și al substanțelor prioritare / prioritar periculoase asupra mediului acvatic prin teste ecotoxicologice – alge verzi, dafnia, pești* trebuie respectată următoarea metodologie [30].

Conform **Ordinului nr. 245 din 26 martie 2005** metodologia utilizată se referă la determinarea toxicității acute și cronice asupra peștilor [30].

Prima desemnare a zonelor vulnerabile și potențial vulnerabile în România a fost efectuată în anul 2003 de ICPA împreună cu Administrația Națională "Apele Române" având în vedere prevederile **HG 964/2000** privind aprobarea Planului de acțiune pentru protecția apelor împotriva poluării cu nitrați proveniți din surse agricole se transpun în legislația românească Directiva Consiliul Europei 91/676/EEC [23].

În această desemnare zonele vulnerabile la nitrați din surse agricole au reprezentat perimetrele a 255 localități din România, ceea ce reprezintă 8,64 % din

suprafața țării, respectiv 13,93% din suprafața totală agricolă a țării.

Zonele vulnerabile la poluarea cu nitrați desemnate în anul 2003 (Fig. 10-13) au fost stabilite pe baza condițiilor naturale de sol, teren, climă și hidrogeologie referitoare la transferul nitraților către corpurile de ape subterane și de suprafață și pe baza bilanțului de azot (azot produs prin dejecțiile animale – azot extras de culturile vegetale) (Tabelul 4) la nivelul unităților administrative corespunzătoare unităților elementare din nomenclatorul european al unităților administrative: comune, orașe, municipii [42]. Au fost identificate trei tipuri de zone vulnerabile:

- **Zone vulnerabile potențiale:** condițiile de transfer al nitraților către corpurile de apă sunt favorabile, dar nu există un bilanț pozitiv al azotului la nivelul localității și concentrația de nitrați din apele subterane măsurată în rețeaua ANAR e sub 50 mg/L

- **Zone vulnerabile cu surse actuale:** condițiile de transfer al nitraților către corpurile de apă sunt favorabile și există un bilanț pozitiv al azotului la nivelul localității

- **Zone vulnerabile din surse istorice:** condițiile de transfer al nitraților către corpurile de apă sunt favorabile, nu există un bilanț pozitiv al azotului la nivelul localității, în trecut au existat complexe zootehnice pe teritoriul localității și concentrația de nitrați din apele subterane măsurată în rețeaua ANAR este peste 50 mg/L.

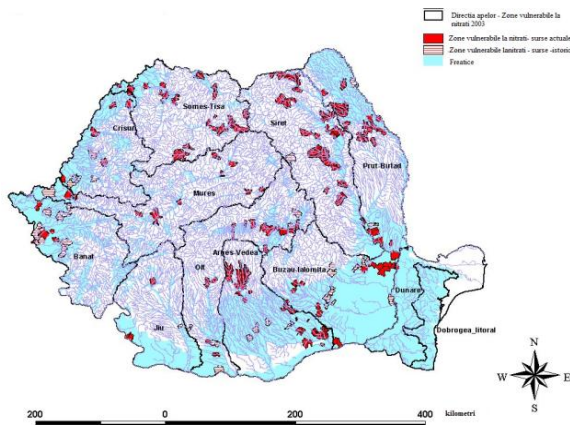


Fig.10. Zone vulnerabile la poluarea cu nitrați – desemnare 2003 [42]

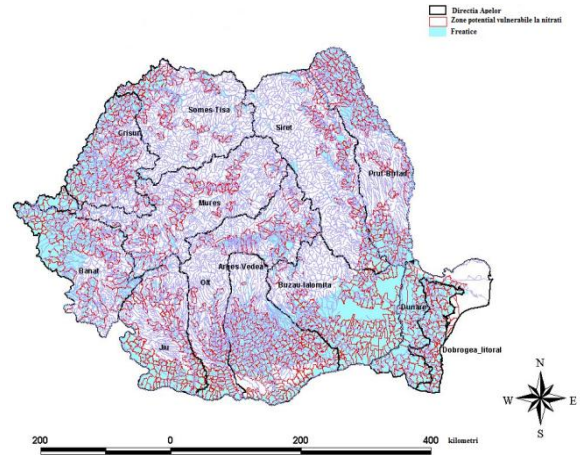


Fig.11. Zone potențial vulnerabile la poluarea cu nitrați – desemnare 2008 [42]

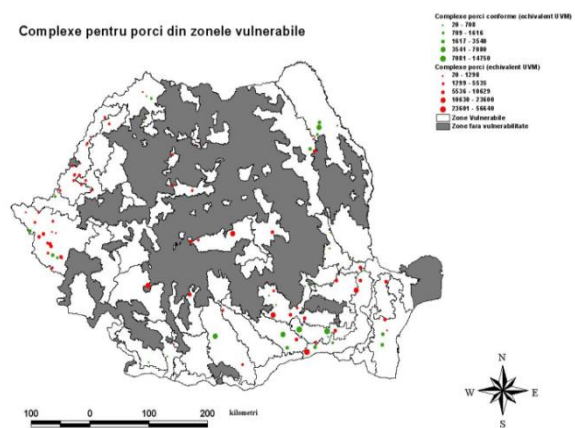


Fig.12. Distribuția complexelor de animale- porci (conforme și ne-conforme) din zonele vulnerabile [42]

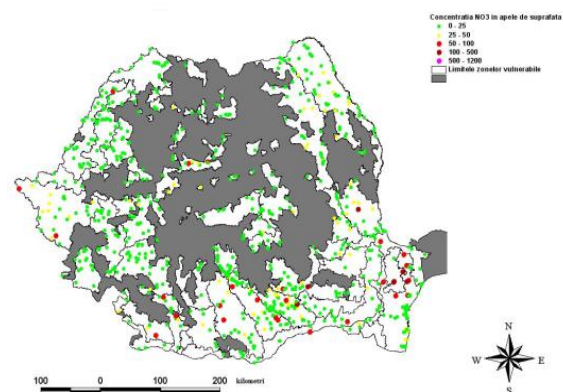


Fig.13. Concentrația maximă (2004-2007) a nitraților pentru măsurarea calității apelor de suprafață [42]

Tabelul 4.

Cantitățile anuale de dejecții și nutrienți pe specii de animale [28, 42]

Specia	Greutatea medie	Producția anuală de gunoi de grajd	Volumul anual de gunoi de grajd	Producția anuală de nutrienți		
	(kg)	(kg)	(litri)	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
Viței sugari	0-50	2.817	3.521	20	4	14
Viței (0,3 – 1 an)	50-250	4.930	6.162	35	5	26
Bovine (1 – 2 ani)	250-600	7.746	9.683	55	20	43
Vaci de lapte	>400	11.408	14.261	81	15	54
Porci	98	1.733	2.167	13	4	8
Porci la îngrășat	68	1.467	1.833	11	4	7
Porci la îngrășat	90	2.000	2.500	15	5	10
Scroafe gestante	125	1.333	1.667	10	4	7
Scroafe cu purcei	170	5.067	6.333	38	13	25
Vieri	160	1.733	2.167	13	4	8
Oi/Capre	45	843	1.054	7	1	5
Păsări reproducție	1,8	18	22	0,36	0,18	0,18
Păsări la îngrășat	0,9	12	15	0,36	0,07	0,1
Cai	450	9.000	12.857	45	8	28


Mulumiri


Această lucrare a fost finanțată din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, POSDRU / 159 / 1.5 / S / 132765 "Programe doctorale și postdoctorale pentru promovarea excelenței în cercetare, dezvoltare și inovare în domeniile prioritare agronomic și medical veterinar ale societății bazate pe cunoaștere".


Bibliografie

- Bouche MB.** (1977). Strategies lombriciennes, Soil Organisms as Components of Ecosystems, *Biol. Bull.*, Stockholm, 25, 122-132.
- Castro J, Perez RA, Sanchez-Brunete C, Tadeo JL** (2001). Analysis of pesticides volatilised from plants and soil by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography, *Chromatographia*, 53, 361.
- Cort LA.** (1973). An Introduction to Spectroscopic Methods for the Identification of Organic Compounds, vol II, editat de Scheinmann F., Pergamon Press, Oxford.
- Cserhati T.** (2002). Mass spectrometric detection in chromatography. Trends and perspectives, *Biomedical Chromatography*, 16, 303-310.
- Farenhorst A, Topp E, Bowman BT, Tomlin AD.** (2000). Earthworm burrowing and feeding activity and the potential for atrazine transport by preferential flow. *Soil biology & Biochemistry*, 32, 479- 488.
- Feisthauer N.** (2003). Using earthworm behavior to assess contaminated soil, ESG International, Environmental Science & Engineering. <http://www.esemag.com/archive/0503/earthworm.html> (accesat la 01.08.2013).
- Gong Z, Ju B, Wan H.** (2001). Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications, *Genetica* 111, 1-3, 213-225.
- Hoffmann E, Charette J, Stroobant V.** (1994). Spectrométrie de masse, Masson, Paris.
- Hong S, Kim J, Lemley AM, Obendorf SK, Hedge A.** (2001). Analytical method development for 18 pesticides in house dust and settled residues using SEC, SPE, TMS methylation, and GC-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 39, 3, 101-112.
- lordache MM.** (2008). Cercetări privind influența unor elemente de tehnologie agricolă asupra pedofaunei (lumbricidelor) cu rol în restaurarea fertilității solurilor, Timișoara, 4-208.
- Kemp W.** (1991) - Organic Spectroscopy, 3rd Ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- Lawrence C.** (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review, Elsevier, *Aquaculture*, 269, 1-20.
- Lawrence JM, Singhal S, Bhatia B, Keegan DJ, Reh TA, Luthert PJ, Khaw PT, Limb AG.** (2007). MIO- M1 cell and similar Muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics, *Stem cells*, 25, 8, 2033-43.
- Manolache C, Boguleanu G.** (1978). Tratat de zoologie agricolă, Dăunătorii plantelor cultivate, Ed. Academiei, 1,158.

15. **Muntean C, Lupa L, Negrea A, Ciopec M.** (2009) – Analiză chimică și fizico-chimică cu aplicații în protecția mediului, *Politehnica*, 187-220.
16. **Scutaru D.** (1998) - Spectrometria de masă, ed. Cerami, 38-149.
17. **Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC.** (1991). Spectrometric Identification of Organic compounds,. Ediția a 5-a, John Wiley and Sons, New York.
18. **Zorn ML, Van Gestel CAM, Eijsackers H.** (2005). Species-specific earthworms population responses in relation to flooding dynamics in a Dutch floodplain soil, *Pedobiologia*, 49, 189-198.
- Legislație surse**
19. **Directiva nr. 278** /12 iunie 1986 CEE privind protecția mediului, în special a solului, atunci când se utilizează nămoluri de epurare în agricultură
20. **Directiva nr. 63** /22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice.
21. **Directiva nr. 676** /12 decembrie 1991 privind protecția apelor împotriva poluării cu nitrați proveniți din surse agricole
22. **Directiva nr. 83** /3 noiembrie 1998 CE privind calitatea apei destinate consumului uman
23. **Hotărârea de Guvern nr. 964/** 13 octombrie 2000 privind aprobarea Planului de acțiuni pentru protecția apelor împotriva poluării cu nitrați proveniți din surse agricole
24. **ISO 15088:** 2007 Water quality- Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)
25. **Legea nr. 458** din 8 Iulie 2002 privind calitatea apei potabile completată cu Legea nr. 311/2004
26. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals** 203 & 207 (accesat la 20.05.2013)
27. **Ordinul nr. 242/197/2005** pentru aprobarea organizării monitoringului pentru reducerea aportului de poluanți proveniți din surse agricole
28. **Ordinul nr. 1552** /2008 pentru aprobarea listei localităților pe județe unde există surse de nitrați din activități agricole
29. **Ordinul nr. 241** /26 martie 2005 și Ordinul nr. 196/7 aprilie 2005 pentru aprobarea Listei localităților pe județe unde există surse de nitrați din activități agricole și a Listei localităților din bazinele / spațiile hidrografice unde există surse de nitrați din activități agricole (zone vulnerabile și potențial vulnerabile).
30. **Ordinul nr. 245** /26/03/2005 pentru aprobarea Metodologiei de evaluare a riscului substanțelor periculoase din listele I și II și al substanțelor prioritare/prioritar periculoase în mediul acvatic prin modelare matematică și a Metodologiei de evaluare a impactului substanțelor periculoase din listele I și II și al substanțelor prioritare/prioritar periculoase asupra mediului acvatic prin teste ecotoxicologice- alge verzi, dafnia, pești.
31. **Ordinul nr. 296** /11 aprilie 2005 și Ordinului nr. 216/ 13 aprilie 2005 privind aprobarea Programului-cadru de acțiune tehnic pentru elaborarea programelor de acțiune în zone vulnerabile la poluarea cu nitrați din surse agricole
32. **Ordonanța de Urgență 195** /2005 privind protecția mediului
33. **Tests for Toxicity of Contaminated Soil to Earthworms** (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*, EPS 1/RM/43, June, 2004.
34. **World Health Organization-** Guidelines for Drinking – water quality, 2011
- Web surse**
35. <http://www.prenhall.com> (accesat la 07.07.2013).
36. <http://pnwsteep.wsu.edu/directseed/conf99/jcdsp.ro.htm> (accesat la 18.07.2013)
37. <http://scitechdaily.com/understanding-pollution-from-green-glowing-zebrafish/> (accesat la 11.06.2013).
38. <http://soils.usda.gov/education/facts/soil.html> (accesat la 19.07.2013)
39. http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf (accesat la 07.08.2013).
40. <http://www.fishforpharma.com/why-zebrafish-17> (accesat la 07.07.2013).
41. <http://www.globalpost.com/photo/5700903/zebrafish-embryos> (accesat la 11.06.2013).
42. http://www.icpa.ro/proiecte/monitoring/atlas/02_Clasa_sol.jpg (accesat la 03.07.2013).
43. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9720701e.pdf?expires=1374160804&id=id&accname=guest&checksum=1DBF099233FD4922C4AD55FA76426327> (accesat la 18.07.2013)
44. <http://www.sas.upenn.edu/~rlnet/Earthworms.html> (accesat la 03.07.2013).
45. <http://www.ucl.ac.uk/zebrafish-group/research/neuroanatomy.php> (acc 10.07.2013).
46. http://www.uclan.ac.uk/facs/science/envman/cwm/erg/erg_faqs.htm (accesat la 03.05.2013)
47. <http://www.nus.edu.sg> (accesat la 11.06.2013).







Rombendazol 2,5%
Suspensie orală, Antihelmintic cu spectru larg

Rombendazol 10%
Suspensie orală, Antihelmintic cu spectru larg

Rombendazol Plus
Suspensie orală, Antihelmintic cu spectru larg


Levamisol
Soluție injectabilă, Antihelmintic cu spectru larg


Fasciocid
Suspensie orală, Antihelmintic


RomIvermectin 1%
Antihelmintic cu spectru larg, Acaricid

RomAvermectin B₁ 1% Plus
Trematocid, nematocid, acaricid, insecticid


Romfenbendazol 10%
Suspensie orală, Antihelmintic








**Distrugătorii tuturor paraziților!
Pentru oi, vaci și capre!**





Grafică: stălcu.catalina@gmail.com

Romvac

TRADIȚIE ȘI INOVAȚIE ÎN SĂNĂTATEA ANIMALELOR

Șos. Centurii nr.7, Voluntari, jud. Ilfov; Tel.: 021 350 31 11, 021 350 31 09; Fax: 021 350 31 10; www.romvac.ro, romvac@romvac.ro

▼ *Lucrări originale / Original papers*

Studiul de degradare forțată a metronidazolului, oxitetraciclinei și furazolidonei folosind Cromatografia de Lichid de Înaltă Performanță

Forced degradation of metronidazole, oxytetracycline and furazolidone Study using High Performance Liquid Chromatography

Violeta Tauber (Giugiu), Viorica Chiurciu

Romvac Company S.A.

Cuvinte cheie: *metronidazol, oxitetraciclina, furazolidona, studiu de degradare forțată, coloana C 18.*

Key words: *metronidazol, oxytetracycline, furazolidone, forced degradation studies, C 18 column.*

Rezumat

Studiul descrie dezvoltarea unei metode HPLC –DAD pentru estimarea metronidazolului, oxitetraciclinei și furazolidonei din produsul Enteroguard M – pulbere. În metoda propusă, separarea s-a făcut pe o coloană Betasil C 18, (4.6 x 250 mm, 5 μm) la 30°C, folosind eluția în gradient a fazei mobile formată din tampon fosfat 40 mM (pH=7.5) și metanol. Achiziția s-a făcut la lungimea de undă de 254 nm, folosind un debit de 1 mL/min. Produsul a fost expus următoarelor condiții de stres: temperatura, lumina, agenți oxidanți, hidroliza în mediu acid și mediu bazic, și probele rezultate au fost analizate prin metoda propusă.

Abstract

The study describes development of a HPLC -DAD method for the estimation of oxytetracycline and furazolidone in Enteroguard M- powder. The proposed method utilizes a Betasil C 18 column, (4.6 x 250 mm, 5 μm), at 30°C, optimum mobile phase consisted of 40 mM phosphate buffer (pH=7.5): methanol in gradient elution. The flow rate was optimized to 1 mL/min and the detection was carried at 254 nm. The drug substance was exposed to temperature, light, oxidants, acid and basic hydrolysis, and the resultant samples were analysed by the proposed method

Introducere

Oxitetraciclina este un antibiotic cu spectru larg, utilizat în medicina veterinară pentru a inhiba sinteza bacteriilor gram-pozitive și gram-negative.

Comunitatea Europeană a aprobat folosirea oxitetraciclinei pentru o gamă variată de specii: pisici, câini, oi, capre și porci.

Atât oxitetraciclina, cât și oxitetraciclina hidrocloridă conțin impurități, care în materia primă nu trebuie să depășească limitele impuse de Farmacopeea Europeană.

Furazolidona este un medicament antibacterian, din clasa nitrofuranilor, care conține în structura moleculară o grupare nitro. Aceasta grupare are o activitate antibacteriană și antiparazitărie largă, și din acest motiv nitrofuranii sunt larg utilizați în

tratamentul infecțiilor gastrointestinale la pasărele de colivie, pisici și câini.

Metronidazolul posedă activitatea contra protozoarelor și bacteriilor anaerobe, fiind utilizat atât preventiv cât și curativ.

Scopul acestui studiu este de a dezvolta o nouă metodă HPLC pentru evaluarea furazolidonei, oxitetraciclinei și substanțelor înrudite din produsele destinate uzului veterinar.

1. Materiale și metodă

1.1. Materiale de referință și reactivi

Standardul de oxitetraciclină, precum și următoarele substanțe înrudite, au fost achiziționate de la Farmacopeea Europeană:

- 4-epioxitetraciclina, (4-EOTC);

- tetraciclina clorhidrat, (TC);
- α -apo-oxitetraciclina, (α -AOTC);
- β -apo-oxitetraciclina, (β -AOTC).
- Standardul de furazolidona a fost achiziționat de la USP.
- Standardul de metronidazol, precum și impuritatea A, au fost achiziționate de la Farmacopeea Europeană.
- **Produsul medicamentos** supus studiului, Enteroguard M – pulbere a fost furnizat de Romvac Company.
- La prepararea tuturor soluțiilor s-a folosit apă ultrapură, obținută in-house cu un sistem Milli-Q (Millipore, USA).
- Metanolul grad HPLC a fost furnizat de Merck.
- Fosfatul de potasiu dibazic grad HPLC, acidul clorhidric și hidroxidul de sodiu au fost furnizate de Fluka.
- Apa oxigenată a fost furnizată de Chimreactiv SRL.
- Acidul ortofosforic 85%, folosit pentru ajustarea pH-ului, a fost achiziționat de la Merck.
- Dimetilformamida folosită pentru prepararea probelor, a fost achiziționată de la Sigma.

1.2. Sistem și condiții cromatografice

Separarea cromatografică a substanțelor active (metronidazol, oxitetraciclina și furazolidona) de impuritățile lor (impuritate A, 4-epioxitetraciclina, tetraciclina, alfa-apo-oxitetraciclina, beta-apo-oxitetraciclina) și de eventualii produși de degradare, s-a făcut pe o coloană Betasil C 18, (4,6 x 250 mm, 5 μ m).

Eluția în gradient, a fazei mobile formată din tampon fosfat 40 mM (pH=7.5) și metanol, reprezintă condițiile potrivite pentru această separare cromatografică.

Achiziția s-a făcut la lungimea de undă de 254 nm, la 30 °C folosind un debit de 1 mL / min.

Gradientul folosit pentru eluție este prezentat în tabelul 1.

Tabelul 1

Programul gradientului folosit pentru separare

Timp (min)	% solvent A METANOL	%solvent B HK ₂ PO ₄
0.00	25.00	75.00
9.00	43.00	57.00
18.00	43.00	57.00
22.00	25.00	75.00
30.00	25.00	75.00

1.3. Prepararea soluțiilor standard

Soluția standard de metronidazol (C= 0.5 mg/mL) a fost preparată în metanol. Soluția standard de furazolidona (C= 0.5 mg / mL) a fost preparată în DMF.

Soluția standard stoc de oxitetracilină (C= 1 mg / mL) a fost preparată în HCl 0,01 M.

Soluțiile de lucru de diferite concentrații (0.08 mg/mL metronidazol, 0.05 mg/mL oxitetraciclina, 0.017 mg/mL furazolidona) au fost preparate din stocurile precizate și diluate cu HCl 0,01 M.

Soluțiile au fost agitate bine, filtrate prin filtru PVDF 0,45 μ m și injectate în sistemul cromatografic.

Prepararea stocurilor de impurități s-a făcut cântărind, separat, 4-epioxitetracilină (C= 1 mg/mL), tetracilină clorhidrat (C= 1 mg/mL), alfa-apo-oxitetracilină (C= 0.08 mg/mL) și beta-apo-oxitetracilină (C= 0.08 mg/mL), etapă urmată de dizolvarea în HCl 0,01 M. Impuritatea A (C= 1mg/mL), a metronidazolului a fost dizolvată în metanol.

Soluțiile s-au agitat pe baie de ultrasunete timp de 10 minute. Soluțiile de lucru de diferite concentrații au fost preparate în HCl 0,01 M. Stocurile soluțiilor standard au fost păstrate la frigider.

1.4. Prepararea soluțiilor de probe

Cantitatea de pulbere echivalentă cu 66.6 mg metronidazol, 40 mg de oxitetracilină și 13.3 mg de furazolidona, a fost cântărită într-un balon cotat de 50 mL. Peste această cantitate s-au adăugat 15 mL de HCl 0,01M, 5 mL metanol și 16 mL DMF,

iar soluția obținută s-a ultrasonat timp de 10 minute.

După răcire, volumul de 50 mL a fost completat cu HCl 0,01M. Din aceasta soluție s-au preparat soluțiile de lucru în HCl 0,01 M, pentru a obține concentrațiile finale de 0.08 mg/mL metronidazol, 0.05 mg/mL oxitettraciclină, 0.017 mg/mL.

Soluțiile au fost agitate bine, filtrată prin filtru PVDF 0,45 μ m și injectate în sistemul cromatografic.

1.5. Studiul de degradare

Studiul de degradare a fost realizat pentru a evalua specificitatea metodei analitice în prezența impurităților și a produșilor de degradare.

Soluția stoc - probă

Intr-un balon cotelat de 50 mL au fost cântărite 0.6666 g de Enteroguard M - pulbere, cantitatea fiind echivalentă cu 66.6 mg metronidazol, 40 mg de oxitettraciclină și 13.3 mg de furazolidonă. Peste această cantitate s-au adăugat 15 mL de HCl 0,01M, 5 mL metanol și 16 mL DMF, iar soluția obținută s-a ultrasonat timp de 10 minute. După răcire, volumul de 50 mL a fost completat cu HCl 0,01M și soluția a fost filtrată pe hârtie de filtru calitativă, tip 1289.

Degradarea în mediu acid

Intr-un balon cotelat de 10 mL, 0.64 mL din soluția stoc de probă au fost tratați cu 6 mL de HCl 0.1 N timp de 90 minute la temperatura de 25⁰ C. După răcire, volumul de 10 mL a fost completat cu HCl 0,01M până la semn. Înainte de injectarea în sistemul cromatografic, soluția a fost filtrată prin filtru PVDF 0,45 μ m.

Degradarea în mediu bazic

Intr-un balon cotelat de 10 mL, 0.64 mL din soluția stoc de probă au fost tratați cu 6 mL de NaOH 0.01 N timp de 90 minute la temperatura de 25⁰ C. După răcire, volumul de 10 mL a fost completat cu HCl 0,01M până la semn. Înainte de injectarea în

sistemul cromatografic, soluția a fost filtrată prin filtru PVDF 0,45 μ m.

Degradarea oxidativă

Intr-un balon cotelat de 10 mL, 0.64 mL din soluția stoc de probă au fost tratați cu 6 mL de H₂O₂ 3% timp de 90 minute la temperatura de 25⁰ C. După răcire, volumul de 10 mL a fost completat cu HCl 0,01M până la semn. Înainte de injectarea în sistemul cromatografic, soluția a fost filtrată prin filtru PVDF 0,45 μ m.

Degradare termică

Intr-un balon cotelat de 10 mL, 0.64 mL din soluția stoc de probă au fost tratați cu 6 mL de HCl 0,01 M timp de 60 minute la temperatura de 60⁰ C. După răcire, volumul de 10 mL a fost completat cu HCl 0,01M până la semn. Înainte de injectarea în sistemul cromatografic, soluția a fost filtrată prin filtru PVDF 0,45 μ m.

Degradarea fotolitică

Intr-un balon cotelat de 10 mL, 0.64 mL au fost expuși la lungimi de undă scurte (253nm) timp de 12 h. După expirarea timpului, volum de 10 mL a fost completat cu HCl 0,01M până la semn. Înainte de injectarea în sistemul cromatografic, soluția a fost filtrată prin filtru PVDF 0,45 μ m.

2. Rezultate și discuții

Metoda propusă s-a dovedit a fi adecvată pentru determinarea metronidazolului, oxitettraciclinei și furazolidonei în prezența agenților de degradare.

Faza mobilă, formată din metanol și fosfat de potasiu dibazic 40 mM ajustat la pH 7.5, este optimă, prezentând o separare corespunzătoare a:

- metronidazolului (t_R = 5.6 min),
- furazolidonei (t_R = 7.2 min),
- oxitettraciclinei (t_R = 10.5 min).

În prezența substanțelor înrudite la un debit de 1 mL/min. Volumul de 10 μ L, lungimea de undă de 254 nm și temperatura de 35 °C s-

au dovedit a fi potrivite pentru această cromatogramele din figurile 1-5, iar metodă. Rezultatele obtinute in urma insumarea parametrilor calculati in tabelele studiului de degradare sunt ilustrate in 3-5.

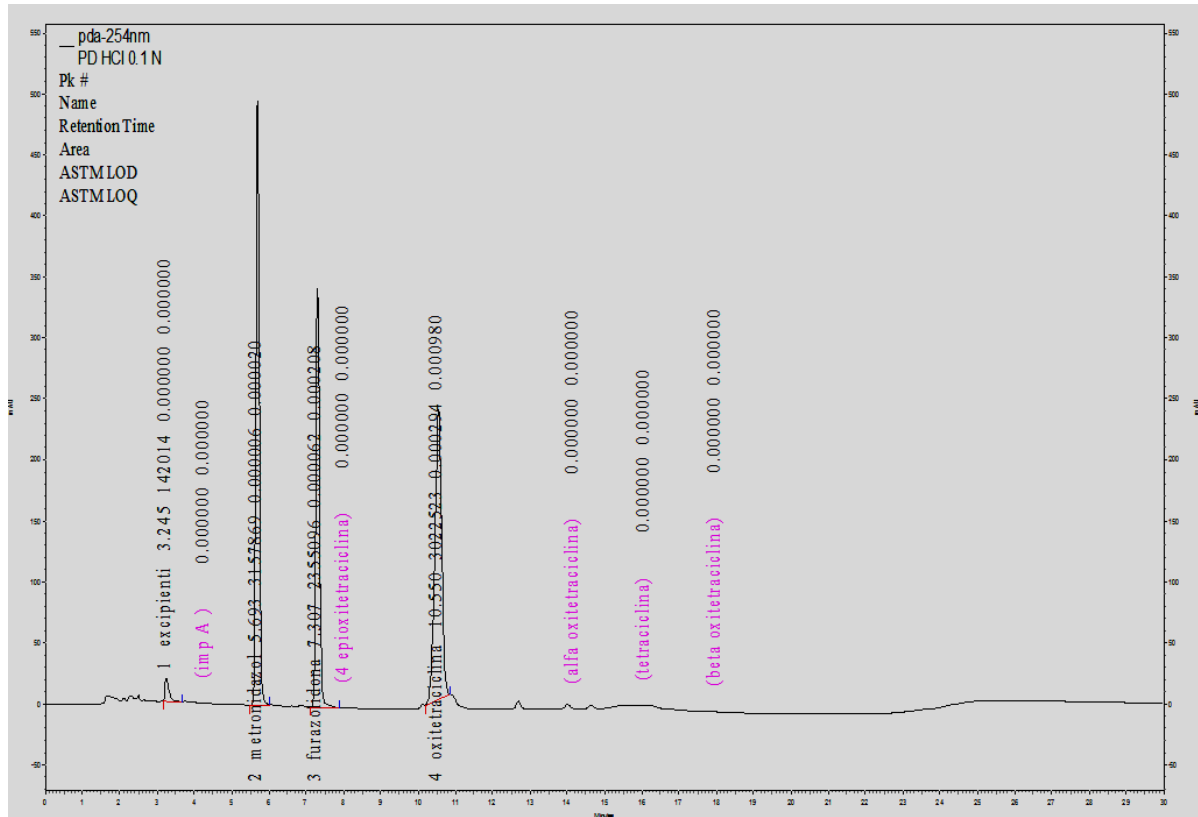


Fig. 1. Degradarea produsului Enterogurd M –pulbere in mediu acid.

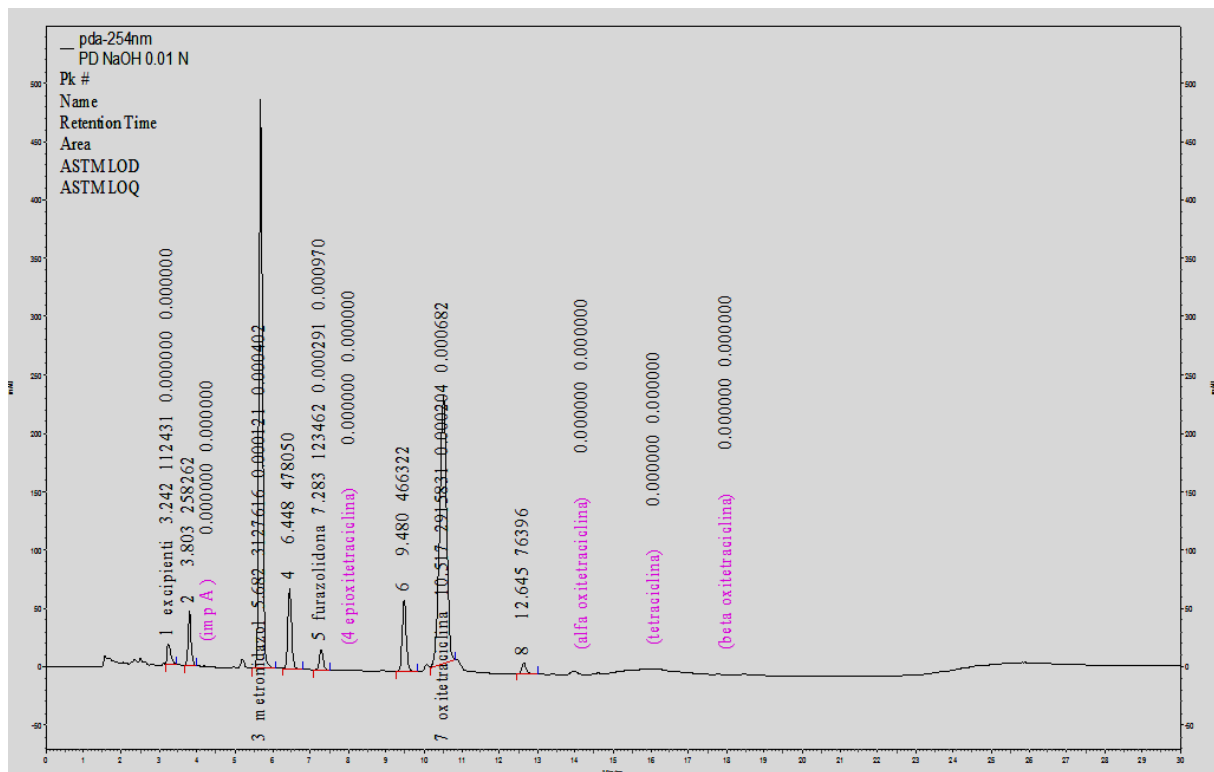


Fig. 2. Degradarea produsului Enterogurd M –pulbere in mediu bazic.

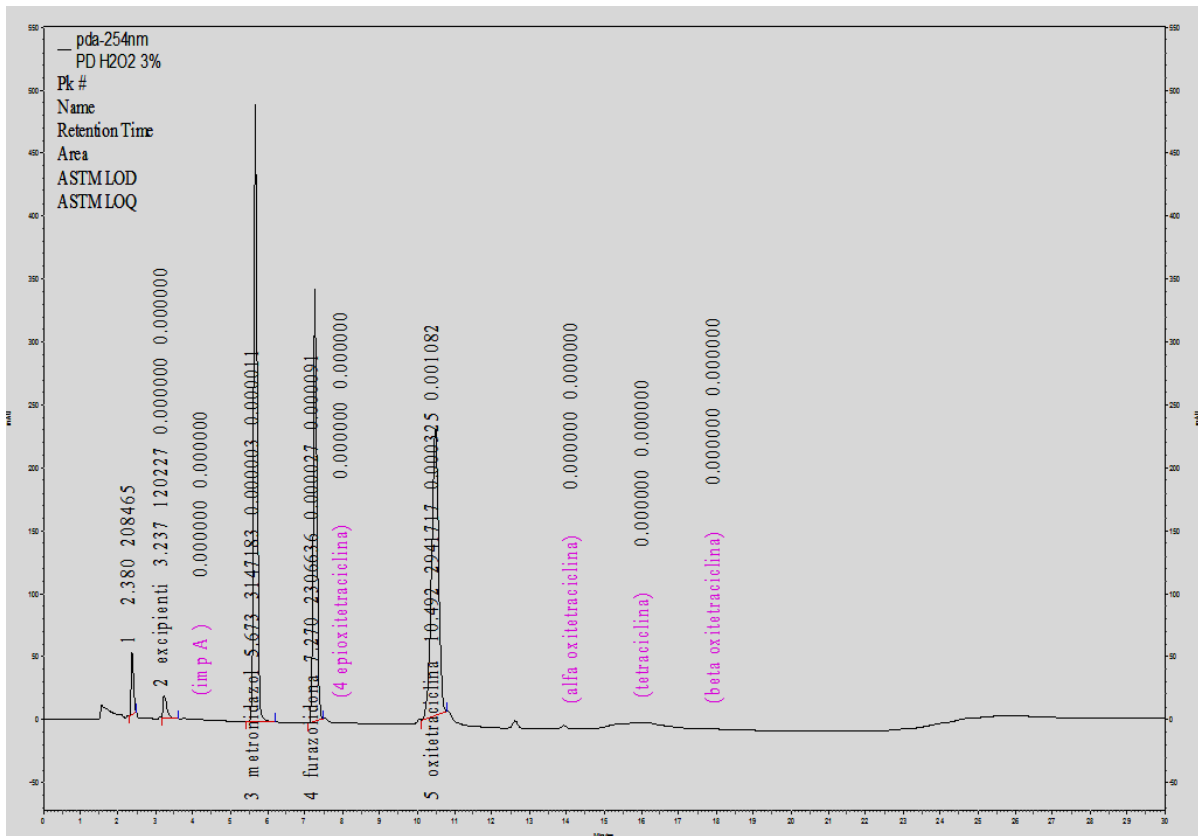


Fig .3. Degradarea produsului Enterogurd M –pulbere in mediu oxidant.

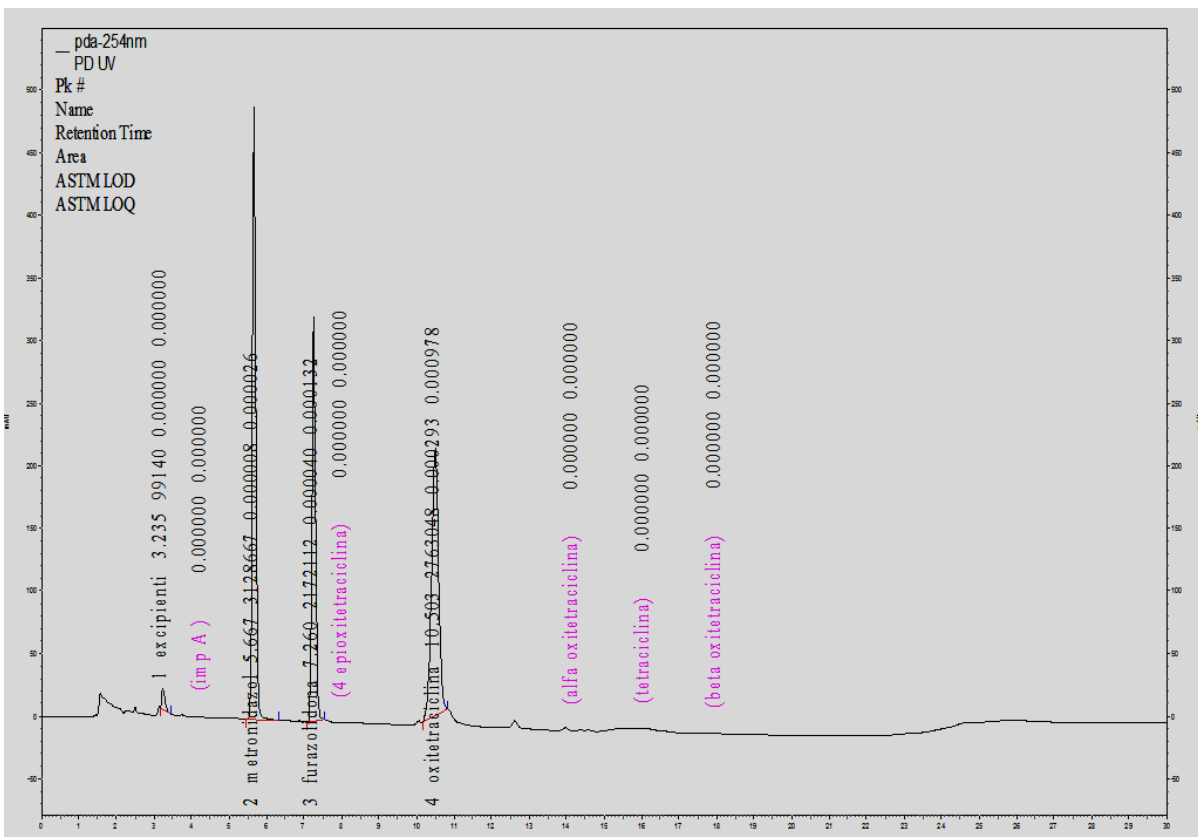


Fig .4. Degradarea produsului Enterogurd M –pulbere in prezenta radiatiilor UV

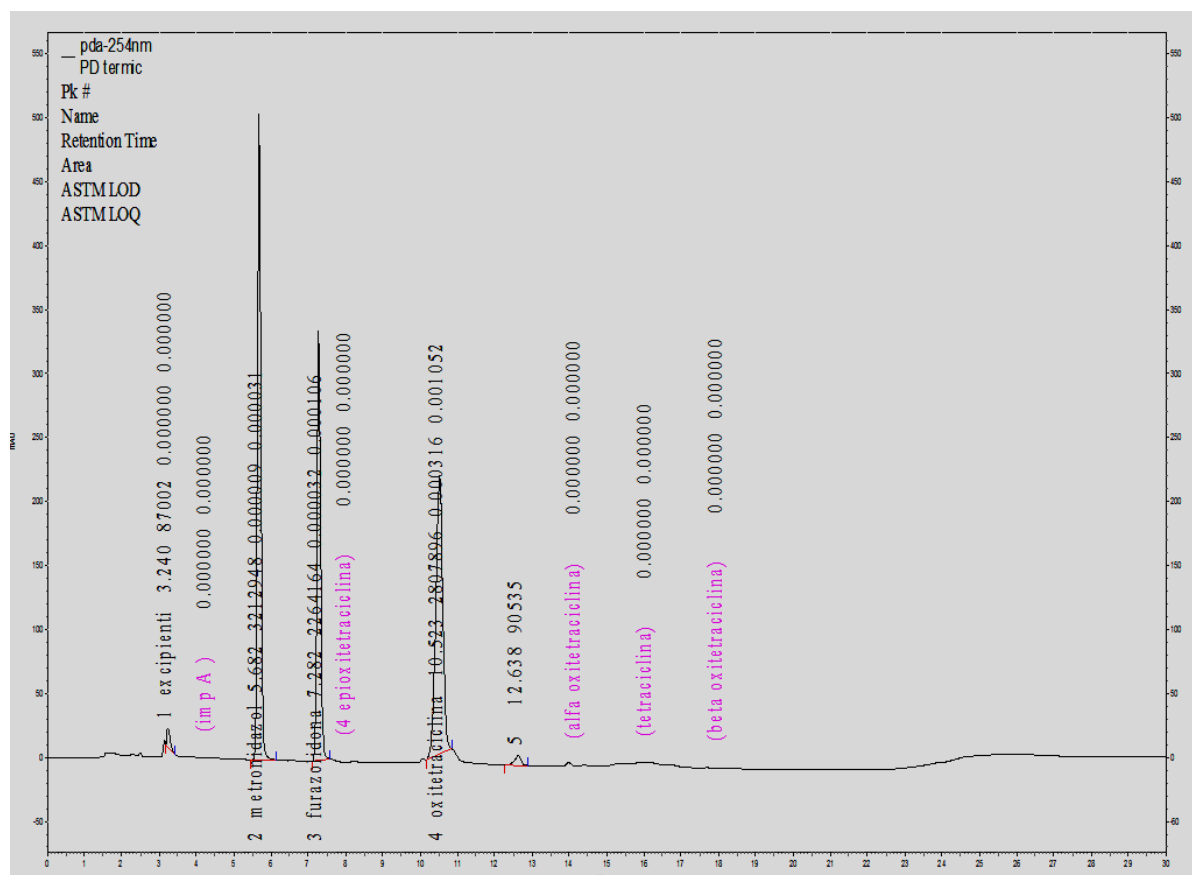


Fig .5. Degradarea produsului Enteroguard M –pulbere in prezenta temperaturii.

Tabelul 3.

Rezultatele obținute pentru Enteroguard M - pulbere în diferite medii de degradare.

Condițiile de stres	Durata de degradare	Parametrii calculati					
	Metronidazol	Aria	% recuperare	% degradare	Timp de retentie	Asimetria	Talere teoretice
enteroguard M pulbere	10 min	3228117			5.68	1.12063	18845.00
PD HCl 0.1 N	90 min	3157869	97.82	2.18	5.69	1.12027	18912.00
PD NaOH 0.01 N	90 min	3127616	96.89	3.11	5.68	1.10828	18763.00
PD H2O2 3%	90 min	3147183	97.49	2.51	5.67	1.11132	18667.00
PD termic	60 min	3128667	96.92	3.08	5.67	1.1239	18871.00
PD UV	720 min	3212948	99.53	0.47	5.68	1.11635	19035.00

Tabelul 4.

Rezultatele obținute pentru Enteroguard M - pulbere în diferite medii de degradare.

Condițiile de stres	Durata de degradare	Parametrii calculati					
	Furazolidona	Aria	% recuperare	% degradare	Timp de retentie	Asimetria	Talere teoretice
enteroguard M pulbere	10 min	2481414			7.282	1.11455	27157
PD HCl 0.1 N	90 min	2355096	94.91	5.09	7.307	1.1207	27461
PD NaOH 0.01 N	90 min	123462	4.98	95.02	7.283	1.10625	26954
PD H2O2 3%	90 min	2306636	92.96	7.04	7.27	1.09643	27164
PD termic	60 min	2172112	87.54	12.46	7.26	1.11123	27408
PD UV	720 min	2264164	91.24	8.76	7.282	1.10136	27536

Tabelul 5.

Rezultatele obținute pentru Enteroguard M - pulbere în diferite medii de degradare.

Condițiile de stres	Durata de degradare	Parametrii calculati					
	Oxitetraciclina	Aria	% recuperare	% degradare	Timp de retentie	Asimetria	Talere teoretice
enteroguard M pulbere	10 min	3106282			10.50	0.91604	16222.00
PD HCl 0.1 N	90 min	3022523	97.30	2.70	10.55	0.92040	16476.00
PD NaOH 0.01 N	90 min	2915831	93.87	6.13	10.52	0.91773	16284.00
PD H ₂ O ₂ 3%	90 min	2941717	94.70	5.30	10.49	0.90556	15752.00
PD termic	60 min	2763048	88.95	11.05	10.50	0.95738	16003.00
PD UV	720 min	2807896	90.39	9.61	10.52	0.93563	16204.00

Concluzii

Lipsa peak-urilor suplimentare, indica faptul ca produsul este stabil in mediu acid.

Produsul Enteroguard M- pulbere este sensibil in mediu alcalin, deoarece dupa expunerea la temperatura de 25 °C in NaOH 0.01N, timp de 90 minute, furazolidona s-a degradat aproximativ 95 %, si apar trei peak-uri suplimentare cu retentie la minutele: 3.8, 6.4, 9.4.

In urma expunerii produsului Enteroguard M pulbere la radiatiile ultraviolete, la temperatura de 60 °C (timp de 60 de minute), precum și în prezența apei oxigenate 3%, nu s-a observat apariția de peak-uri de degradare, ceea ce indica faptul ca produsul este stabil in prezenta urmatoilor agenti: oxidat, termic si fotolitic.

Studiul de degradare ne indica faptul ca in mediul bazic, furazolidona se degradeaza 95%, in timp ce in mediu fotolitic, furazolidona se degradeaza 12%, iar oxitetraciclina 11%.

În acest studiu a fost folosita o metoda HPLC noua pentru determinarea impuritatilor si substantelor active din produsul Enteroguard M pulbere în prezenta agentilor de degradare.

Metoda poate fi aplicată cu succes pentru acest produs deoarece nu s-au observat interferențe datorate excipienților sau altor compuși rezultați din produsul farmaceutic.

Bibliografie

1. Smyrniotakis, CG, Archontaki HA (2007). C 18 columns for the simultaneous determination of oxytetracycline and related substances by reversed-phase high performance liquid chromatography and UV detection.
2. Yunqi Wu, Reza Fassihi (2005). Stability of metronidazole, tetracycline HCl and famotidine alone and in combination
3. Pietruszka K, Olejnik M, Sell B. (2007). Development and validation of liquid chromatography method for the determination of nitrofurans in water.
4. Rajyalakshmi. Ch, benjamin. T and rambabu. C Pietruszka K, Olejnik M, Sell B. (2013). Forced degradation study on dronedarone and application of validated stability- indicating HPLC-UV method in stability testing of dronedarone tablets.
5. European Pharmacopoeia 7.0 (2011), 2651-2653.
6. www.ich.org

Dezvoltarea si validarea unei metode HPLC pentru determinarea metronidazolului, oxitetraciclinei si furazolidonei din produse farmaceutice veterinare

Development and validation of a HPLC method for the determination of metronidazole, oxytetracycline and furazolidone in veterinary formulations

Violeta Tauber (Giugiu), Viorica Chiurciu
Romvac Company S.A.

Cuvinte cheie: *determinare simultană, metronidazol, furazolidona, oxitetraciclinei, metoda HPLC*
Key words: *simultaneous determination, metronidazole, furazolidone, oxytetracycline, HPLC method*

Rezumat

Determinarea metronidazolului, oxitetraciclinei si furazolidonei s-a facut printr-o metoda de cromatografie de lichid de inalta performanta, prin elutie izocratica. Faza mobila a fost formata din fosfat de potasiu monobazic 50 mM cu pH 2.5, metanol si acetonitril (70:18:12). Detectia s-a facut la lungimea de unda de 264 nm, folosind un debit de 1.100 mL/min. Separarea s-a realizat pe o coloana Nucleosil C18 column, 5 µm 250 mmx 4.6 mm, mentinuta la temperatura de 25 °C. Metoda a fost validata urmarind parametrii: system suitability, liniaritate, limita de detectie si de cuantificare, precizie si acuratete.

Abstract

An isocratic reversed phase high performance liquid chromatographic method with DAD detection was developed for the analysis of metronidazole, oxytetracycline and furazolidone. The mobile phase consisted of pH 2.5 phosphate buffer solution, methanol and acetonitrile (70:18:12). The UV detection was carried out at 264 nm, and the flow rate was 1.100 mL/min. The separation was carried out on a Nucleosil C18 column, 5 µm 250 mmx4.6 mm, which was maintained at 25 °C. This method was validated by system suitability parameters, linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy

Introducere

Oxitetraciclina este un antibiotic cu spectru larg, utilizat în medicina veterinară pentru a inhiba sinteza bacteriilor gram-pozitive și gram-negative.

Comunitatea Europeană a aprobat folosirea oxitetraciclinei pentru o gamă variată de specii: pisici, câini, oi, capre și porci. Atât oxitetraciclina, cât și oxitetraciclina hidroclorică conțin impurități, care în materia primă nu trebuie să depășească limitele impuse de Farmacopeea Europeană.

Furazolidona este un medicament antibacterian, din clasa nitrofuranilor, care conține în structura moleculară o grupare nitro. Aceasta grupare are o activitate antibacteriană și antiparazitărilor largă, și din

acest motiv nitrofuranii sunt larg utilizați în tratamentul infecțiilor gastrointestinale la pasărele de colivie, pisici și câini.

Metronidazolul posedă activitatea contra protozoarelor și bacteriilor anaerobe, fiind utilizat atât preventiv cât și curativ.

Metoda propusă este simplă, precisă, specifică și mai presus de toate, este adecvată pentru determinarea metronidazolului, oxitetraciclinei și furazolidonei din produsul Enteroguard M-pulbere.

1. Materiale și metodă

1.1. Materiale de referință și reactivi

- Standardul de metronidazol a fost achiziționat de la Sigma.

- Standardul de oxitetraciclină de la Farmacopeea Europeană.
- Standardul de furazolidona a fost achiziționat de la USP Produsul farmaceutic supus studiului, Enteroguard M comprimate a fost furnizat de Romvac Company.
- La prepararea tuturor soluțiilor s-a folosit apă ultrapură, obținută in-house cu un sistem Milli-Q (MILLIPORE, USA).
- Metanolul și acetoneitrilul grad HPLC, au fost furnizate de Merck.
- Fosfatul de potasiu monobazic grad HPLC și acidul clorhidric au fost furnizate de Fluka.
- Acidul ortofosforic 85%, folosit pentru ajustarea pH-ului, a fost achiziționat de la Merck.
- Dimetilformamida (DMF) folosită pentru prepararea probelor, a fost achiziționată de la Sigma.

1.2. Sistem și condiții cromatografice

Sistemul cromatografic folosit LC Surveyor (Thermo Electron Corporation, USA) este echipat cu pompă cuaternară, autosempler, bucla de 25 μ L, termostat pentru coloană, termostat pentru autosampler și detector UV-VIS diode array.

Întregul sistem cromatografic este controlat cu softul ChromQuest.

Separarea cromatografică s-a realizat pe o coloană Nucleosil C18, 5 μ m, 250 mm x 4,6 mm. Faza mobilă folosită conține: fosfat de potasiu monobazic 50 mM cu pH 2.5, metanol și acetoneitril (70:18: 12).

Debitul de 1.1 mL/min, lungimea de undă de 254 nm și volumul de injecție de 10 μ L sunt parametrii setați pentru această metodă.

1.3 Preparare soluții standard stoc

Soluția standard de metronidazol a fost preparată dizolvând 10 mg de standard în 10 mL de metanol.

Soluția standard de furazolidona a fost preparată dizolvând 10 mg de standard în 10 mL DMF.

Soluția standard stoc de oxitetraciclină clorhidrat a fost preparată, dizolvând 10 mg de standard în 10 mL HCl 0,01 M.

1.4. Prepararea probelor

Într-un balon cotelat (de 50 mL) au fost cântărite 0.254 g de Enteroguard M - pulbere, (cantitate echivalentă cu 25 mg de metronidazol, 15 mg de oxitetraciclină și 5 mg de furazolidona.

Peste această cantitate s-au adăugat 5 mL de HCl 0,1M, 8 mL DMF și 15 mL apă, iar soluția obținută s-a ultrasonat timp de 10 minute.

1.5. Validarea metodei cromatografice

Această metodă a fost validată urmărind mai mulți parametri: specificitate, liniaritate, limită de detecție și cuantificare, precizie și acuratețe.

Specificitatea a fost verificată calculând parametrii ca: timp de retenție, talere teoretice, asimetrie, rezoluție și factor de capacitate.

Pentru stabilirea liniarității curbelor de calibrare, o serie de cinci concentrații în domeniul 10%-200% au fost preparate din soluțiile stoc de metronidazol, oxitetraciclină și furazolidonă.

Curbele de calibrare efectuate au fost folosite pentru determinarea limitelor de detecție și de cuantificare.

Precizia metodei a fost determinată prin injectarea a șase probe individuale de Enteroguard M- pulbere.

Acuratețea metodei poate fi evaluată prin procente de recuperare ale metronidazolului, oxitetraciclinei și furazolidonei.

Studiul de recuperare a fost realizat folosind soluții de probă cu concentrațiile în domeniul 80%-120%.

2. Rezultate și discuții

Obiectivul acestei metode a fost de a dezvolta o metodă HPLC, care să permită separarea metronidazolului, oxitetraciclinei și furazolidonei.

O cromatogramă tipică a unei probe de Enterogurd M-pulbere este prezentată în figura 1. Substanțele active au fost separate cu o asimetrie bună în opt minute.

Timpii de retenție au fost 2.5, 4.1 și respectiv 5.3 pentru metronidazol, oxitetraciclina și furazolidona.

Confirmarea identificării substanțelor active a fost făcută cu ajutorul soft-ului, cu care s-au calculat și alți parametri de performanță ca rezoluția, asimetria, timpul de retenție și talerele teoretice, tabelul 2.

Evaluarea statistică a rezultatelor obținute pentru substanțele active din produsul Enteroguard M –pulbere sunt prezentate în tabelul 3.

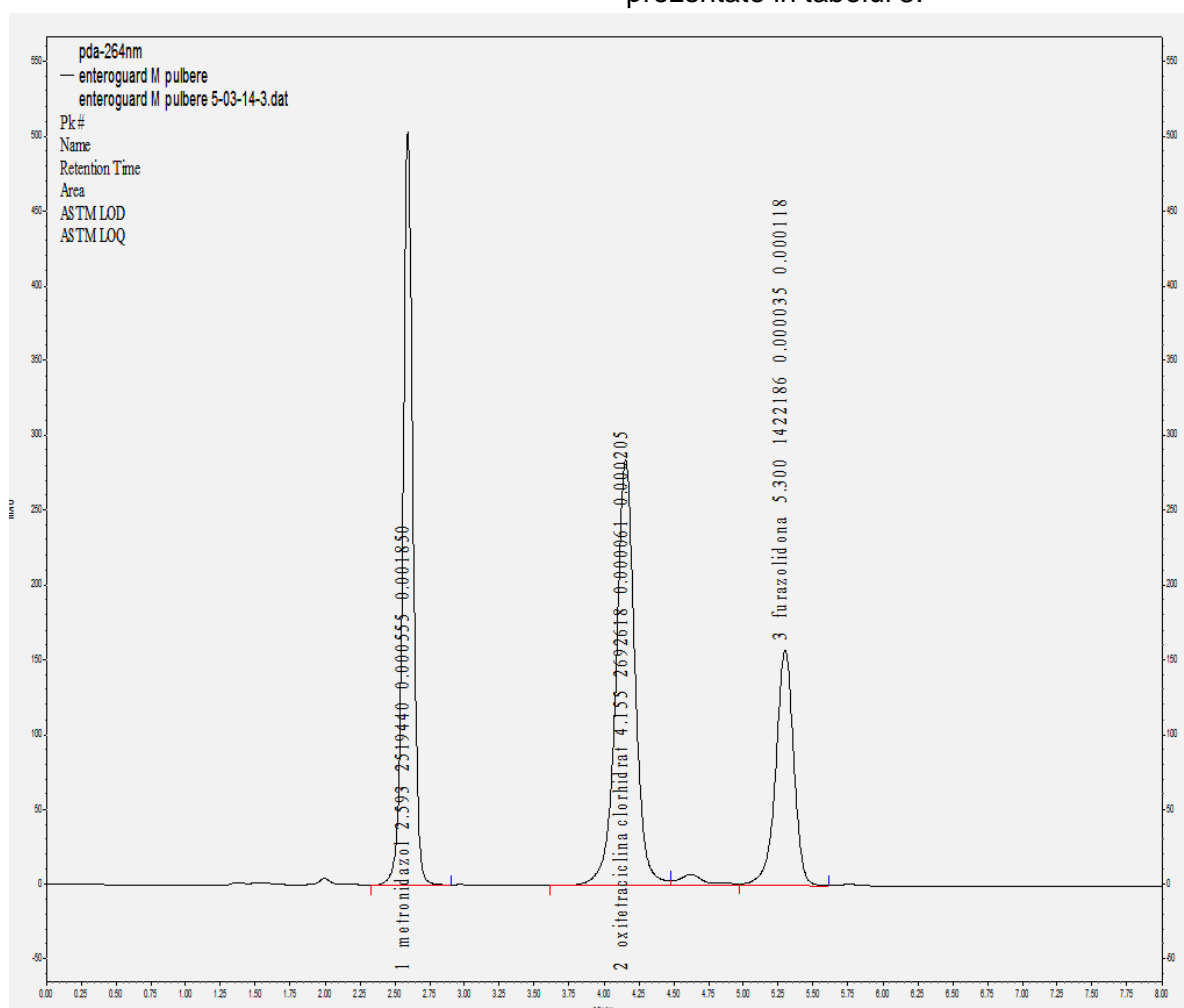


Fig.1. Cromatogramă tipică a produsului Enterogurd M - pulbere

Tabelul 1

Parametrii calculați pentru amestecul din figura 1.

Substanța	Timp Retenție	Aria	Rezoluție	Asimetria	Capacity factor	Talere teoretice
Metronidazol	2.593	2519440	0.00000	1.01999	2	6726
Oxitetraciclina clorhidrat	4.155	2692618	8.67410	0.97944	3	5021
Furazolidona	5.300	1422186	4.96785	0.90892	4	8673

Tabelul 2

Rezultatele metodei validate

Parametri de validare	Metronidazol	Oxitetraciclina	Furazolidona
LOD mg/mL	0.000358	0.000130	0.001109
LOQ mg/mL	0.001194	0.000432	0.003696
Ecuatie de regresie	$y=2.26968e-008x-0.00134127$	$y=1.21776e-008x-4.94260e-006$	$y=7.58344e-008x-4.94260e-006$
Coeficientul de corelatie (r2)	0,998711	0.999608	0.999608
Domeniul de liniaritate mg/mL	0.005-0.1	0.003-0.06	0.001-0.02
Repetabilitate %RSD n=6	0.356	0.301	0.333
Reproductibilitate %RSD	0.525	0.383	0.500
% recuperare	100.7	97.49	89.72

Concluzii

In acest studiu, parametrii analitici pentru cele trei substante active au fost optimizati folosind cromatografie de lichid de inalta performanta.

Separarea s-a facut izocratic, cu faza mobila formata din fosfat de potasiu monobazic 50 mM cu pH 2.5, metanol si acetonitril (70:18: 12) si un debit de 1.100 mL/min.

Timpul analizei cromatografice a fost scurt (8 min), iar rezolutia peak-urilor este buna pentru toate substantele active.

In concluzie, acest studiu demonstreaza ca metoda analitica aplicata este sensibila, selectiva si rapida pentru determinarea metronidazolului, oxitetracilinei si furazolidonei din produsul Enteroguard M – pulbere.

Bibliografie

1. C.G.Smyrniotakis, Helen A. Archontaki (2007). C 18 columns for the simultaneous determination of oxytetracycline and related substances by reversed-phase high performance liquid chromatography and UV detection.
2. Yunqi Wu, Reza Fassihi (2005). Stability of metronidazole, tetracycline HCl and famotidine alone and in combination
3. Katarzyna Pietruszka, Malgorzata Olejnik, And Bartosz Sell (2007). Development and validation of liquid

chromatography method for the determination of nitrofurans in water.

4. Rajyalakshmi. Ch, benjamin. T and rambabu. C Katarzyna Pietruszka, Malgorzata Olejnik, And Bartosz Sell (2013).forced degradation study on dronedarone and application of validated stability- indicating HPLC-UV method in stability testing of dronedarone tablets.
5. European Pharmacopoeia 7.0 (2011), 2651-2653.
6. www.ich.org

Sănătate fără frontiere!



Romvac
TRADIȚIE ȘI INOVAȚIE ÎN SĂNĂTATEA ANIMALELOR

ECVIROM & ECVIROM I sunt 2 produse complementare care tratează toți paraziții la cabaline. Folosite prin rotație, împiedică apariția fenomenului de rezistență a paraziților la substanțele din compoziție.



ECVIROM

Suspensie orală
Antihelmintic cu
spectru larg
pentru cabaline
de agrement



ECVIROM I

Suspensie orală
Antihelmintic cu
spectru larg
pentru cabaline



Romvac
TRADIȚIE ȘI INOVAȚIE ÎN SĂNĂTATEA ANIMALELOR

Șos. Centurii nr.7, Voluntari, jud. Ilfov; Tel.: 021 350 31 11, 021 350 31 09; Fax: 021 350 31 10; www.romvac.ro, romvac@romvac.ro

Gratific: statutu.catalina@gmail.com

Interacțiunea de tip sinergic dintre paracetamol (acetaminofen) și carbamazepină la șoarece

Synergistic interaction between acetaminophen and carbamazepine in mice

Lidia Cristina Chițac¹, S. Beșchea^{2*}, Monica Neamțu¹, Delia Bulea¹, Veronica Bild¹

¹Department of Pharmacodynamics and Clinical Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, „Grigore T. Popa” Iași

²Department of Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, USAMV Iași

* Corresponding author

Cuvinte cheie: carbamazepină, synergism, cytokine, acetaminophen

Key words: carbamazepine, synergism, cytokine, acetaminophen

Rezumat

Studiul de față își propune investigarea tipului de interacțiune farmacodinamică și demonstrarea acțiunii antinociceptive a unei combinații binare în proporție fixă între un analgezic non-opioid (Acetaminofen) și un anticonvulsivant (carbamazepină) ca o modalitate rațională de tratament al durerii. Toate procedeele experimentale utilizate în realizarea acestui studiu au fost în strânsă concordanță cu reglementările bioetice internaționale referitoare la experiențele realizate pe animale de laborator. Pentru cuantificarea interacțiunii s-a utilizat metoda dreptei aditive compuse, care permite evaluarea cantitativă a interacțiunilor de tip farmacodinamic din combinațiile binare în proporție fixă. Interacțiunea între aceste substanțe este de tip sinergic (potențare), dovedită prin deplasarea la stânga a dreptei de regresie a asocierii față de dreapta aditivă compusă. Parametrii statistici ai analizei de regresie pun în evidență synergismul dintre cele două substanțe ($Z_{mix} = 39.276 \pm 7.54 \text{ mg/kg}$ ($Z_{mix} < Z_{add}$), indice de interacțiune $\gamma = 0,387$, $p < 0.05$, $t_c = 3.753$, $t_t = 3.511$, $F_c = 10.825$, $F_t = 4.260$). Synergismul dintre cele două substanțe se explică prin mecanismele de acțiune specifice fiecărei substanțe.

Abstract

This study aims to demonstrate the type of pharmacodynamic interaction and the demonstration of an antinociceptive action of fixed-ratio binary combinations between a non-opioid analgesic (acetaminophen) and an anticonvulsant (carbamazepine) as a rational way to treat pain. All experimental procedures used in this study were closely in line with international bioethical regulations on experiments conducted on laboratory animals. For quantifying the interaction, we used the method of the additive composite curve, which allows the quantitative assessment of the pharmacodynamic interactions of binary combinations in fixed proportion. The interaction between these substances is the synergistic (potentiation), as evidenced by the left shift of the regression curve of the combination compared to the composite additive curve. The statistical parameters of regression analysis reveal the synergism between the two substances ($Z_{mix} = 39.276 \pm 7.54 \text{ mg / kg}$ ($Z_{mix} < Z_{add}$) the interaction index $\gamma = 0.387$, $p < 0.05$, $t_c = 3.753$, $t_t = 3.511$, $F_c = 10.825$, $F_t = 4.260$). The synergism between the two substances is explained by the specific action mechanisms of each substance.

Introducere

Terapia analgezică modernă este dominată la ora actuală de cele două clase principale de medicamente analgezice și anume: analgezice opioide și analgezice neopioide (analgezice antipiretice și antiinflamatoare nesteroidiene AINS). În privința substanțelor analgezice-AINS, s-au

dezvoltat o multitudine de noi variante sintetice îmbunătățite, la fel ca și o serie de căi de administrare optimizate, dar inovațiile conceptuale nu au fost pe deplin satisfăcătoare. Aceasta se datorează, probabil, unui avans relativ lent al înțelegerii patogenezei durerii inflamatorii.

Pe de altă parte, un principiu formulat în cadrul farmacologiei asocierilor de

analgice, ca o modalitate rațională de ameliorare a tratamentului durerii, este acela că, asociind substanțe medicamentoase cu mecanisme de acțiune diferite, se poate obține o acoperire multimodală a unui spectru mai larg de tipuri de durere, creând, în acest mod, posibilitatea potențială ca interacțiunea care apare să fie mai mare decât aditivă, adică sinergică [14].

În studiile noastre a fost luat în considerație rolul citokinelor proinflamatoare în stările de durere patologică [22].

În această lucrare se tentează luarea în discuție a perspectivelor unor asocieri (combinații) între medicamente care să influențeze durerea din procesele inflamatorii.

1. Material si metoda

În cercetările din prezenta lucrare s-au utilizat șoareci masculi Swiss (Sursa Institutul Cantacuzino București) cu greutatea 20-25 g. Condițiile de habitat s-au realizat în incinta laboratorului de Farmacodinamie experimentală din cadrul disciplinei de Farmacodinamie și Farmacie clinică, UMF „Grigore T. Popa” Iași, într-o cameră cu temperatură și umiditate controlată ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), și un ciclu de lumină/întuneric, 12ore/12 ore (07.00AM / 07.00PM).

Animalele au fost cazate în cuști de plexiglas, prevăzute cu adăpător grupate câte 8-10 animale-cușcă. Acestea au primit apă și hrană standard (sursa Biobaza Baneasa). Testările au fost efectuate începând cu orele 10.00 AM. Cu 3 ore înainte de testări s-a sistat accesul la hrană și apă. Toate procedeele experimentale utilizate în realizarea acestui studiu au fost în strânsă concordanță cu normele specifice aprobate în UMF „Grigore T. Popa” și reglementările bioetice internaționale referitoare la experiențele realizate pe animale de laborator [23].

În acest studiu s-au utilizat următoarele substanțe:

- acetaminofen (Sigma),
- carbamazepină (Sigma),
- Zymosan A (Sigma),
- CMC-Na (Sigma),
- ser fiziologic (Zentiva).

Carbamazepina și acetaminofenul au fost administrate singure și în asociere pe cale orală în secvențe de doze în progresie geometrică. S-a utilizat un model de nocicepție cu stimul chimic cu specificitate pentru durerea inflamatoare. În acest studiu testul răspunsului constrictiv abdominal (metoda lui Siegmund și col. 1957, tehnica lui Koster și col. 1959) constă în administrarea intraperitoneală a unei suspensii de Zymosan A în doză de 40mg / Kgc. la șoarece [20]. Se înregistrează numărul de răspunsuri constrictive abdominale timp de 12 minute după administrarea agentului iritant [21].

Interpretarea datelor a fost de tip cantal caracterizată de prezența sau absența răspunsului calculându-se efectul maxim posibil:

$$\% \text{ (antinocicepție) inhibiție} = \frac{\text{nr. non-responderi}}{\text{nr total de animale}} \times 100 \text{ [19].}$$

Pentru cuantificarea interacțiunii s-a utilizat metoda dreptei aditive compuse care permite evaluarea cantitativă a interacțiunilor de tip farmacodinamic din combinațiile binare în proporție fixă [18, 19].

Metoda are la bază analiza dreptelor de regresie, dreapta de regrese a asocierii față de dreapta aditivă compusă pentru nivelul de activitate de 50%. Indexul de interacțiune indică tăria sinergismului. În analiza statistică pentru toate testele de semnificație statistică, s-a considerat că pentru valori $P < 0,05$ există o diferență semnificativă statistic între grupele comparate (ANOVA Test, *t* - test).

2. Rezultate si Discutii

S-au administrat pe cale orală doze succesive de paracetamol în progresie geometrică cuprinse între: $50.00-600.00 \text{ mgkg}^{-1}$.

Prin administrarea acestora s-a obținut un efect maxim posibil de 100% pentru doza de 600 mg/kg. Datele au permis determinarea valorii DE50 a paracetamolului. (Tabelul 1)

S-au administrat pe cale orală doze succesive de carbamazepină în progresie geometrică cuprinse între 7.5-60.00 mg/kg. Prin administrarea acestora s-a obținut un efect maxim posibil de 80% pentru doza de 60.00 mg/kg. Datele au permis determinarea valorii DE50 a carbamazepinei (Tabelul 1).

Tabel 1

Valoarea DE 50 a medicamentelor luate în studiu administrate singure

Valoare	Acetaminophen (Paracetamol)	Carbamazepină (CBZ)
DE50 (SEM) ¹ mgkg ⁻¹ / p.o	162.48 (26.24)	41.14 (12.20)
	Y = -2.367 + 3.33*X R = 0.948	Y = 0.59 + 2.72*X R = 0.976

¹SEM, Eroarea standard a mediei

Datele obținute în tabelul 1 au permis trasarea dreptei de regresie pentru dreapta aditivă compusă pentru stabilirea valorii Zadd. (Fig. 1).

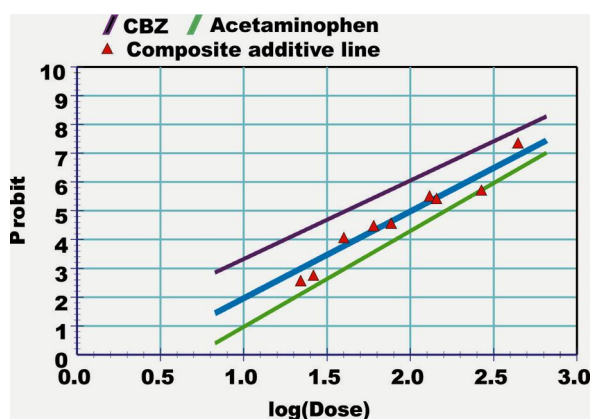


Fig. 1 Analiza dreptei aditive compuse a asocierii CBZ-Paracetamol

Din analiza dreptei de regresie (Fig. 1) și tabelul 1 se observă că s-a putut pune în evidență efectul antinociceptiv al carbamazepinei (DE50 = 41.14 ± 12.20 mgkg⁻¹) și a paracetamolului (162.48 ± 26.24 mgkg⁻¹) pe modelul de nocicepție studiat. După determinarea acestor valori s-a demonstrat o valoare Zadd = 101.59 ± 14.54 mgkg⁻¹ și proporțiile celor două substanțe (Tabelul 2). După administrarea combinației în proporție fixă, serii succesive de doze în progresie geometrică, am constatat următoarele:

Zmix = 39.276 ± 7.54 mg/kg (Zmix < Zadd), indice de interacțiune $\gamma = 0,387$, $p < 0.05$ (Tabelul 2). Interacțiunea între aceste substanțe este de tip sinergic (potențare). Aceasta este dovedită prin deplasarea la stânga a dreptei de regresie a asocierii față de dreapta aditivă compusă (Fig. 2).

Parametrii statistici ai analizei de regresie pun în evidență sinergismul dintre cele două substanțe ($t_c = 3.753$, $T_t = 3.511$, $F_c = 10.825$, $F_t = 4.260$).

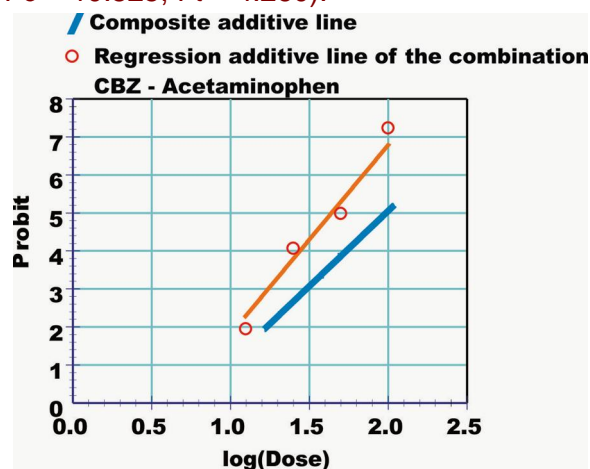


Fig. 2 Dreapta de regresie a asocierii paracetamol-CBZ față de dreapta aditivă compusă.

Table 2

Valoarea DE50 a medicamentelor luate în studiu administrate în asociere

Substanța	Doza totală mg/kg/p.o	Efect maxim posibil (EMP) %	ED50 (SEM)	
			Zadd (SEM)	Zmix (SEM)
Acetaminophen / CBZ (0.798/0.202)	12.20	16.66	101.59 (14.54)	39.276 (7.54) ¹
	25.40	33.33	Y = 3.02 + 0.57*X	Y = -3.17 + 4.97*X
	50.80	66.66	R = 0.959	R = 0.953
	101.59	100.00		Interaction index=0.387

¹Combinație sinergică

Testul răspunsului constrictiv abdominal permite aprecierea analgeziei centrale și periferice. Testul poate utiliza o serie de agenți iritanți cum ar fi acetilcolină bromid, acid acetic, Zymosan A. Prin utilizarea agentului iritant Zymosan A modelul capătă o specificitate pentru patogeniza durerii inflamatoare [12, 21].

O serie de autori au arătat că prin administrarea intraperitoneală de Zymosan A, la șoarece, apare un răspuns inflamator, caracterizat prin răspuns constrictiv abdominal, extravazare de plasmă, infiltrare leucocitară și biosinteză de eicosanoide Doherty cit Pettipher, 1997 [12].

În ultimul timp s-a pus în evidență că agenții inflamatori nu stimulează direct eliberarea de mediatori primari hipernociceptivi, ci că eliberarea lor este precedată de o cascadă de citokine [5, 15]. S-a pus în evidență că, la șoarece, răspunsul constrictiv abdominal la zymosan și acid acetic este mediat prin TNF-alfa, IL1-beta și IL8, care acționează concomitent și sinergic [15].

Paracetamolul are efecte analgezice și antipiretice similare cu AINS.

Totuși, spre deosebire de acestea, paracetamolul administrat în doze terapeutice are activitate antiinflamatorie și antiplachetară foarte mică sau inexistentă și nici nu manifestă profilul efectelor secundare de tip AINS, precum leziuni ale tractului gastro-intestinal, bronhoconstricția indusă de acid acetic salicilic.

De aceea paracetamolul a înlocuit pe scară largă acidul acetilsalicilic și alți salicilați în tratamentul durerilor ușoare spre moderate, care nu sunt asociate cu procese inflamatorii, precum cefaleea, durerile dentare și dismenoreea [2].

Deși a fost sintetizat în urmă cu mulți ani și utilizat intens în tratamentul durerii, mecanismul său de acțiune rămâne încă necunoscut. Mecanismul cel mai probabil rămâne cel de inhibiție a ciclooxigenazei. Unele cercetări au testat eventuala

interferență între paracetamol și NOs (nitric-oxid-sintaza) atât constitutivă cât și inductibilă [2], alte cercetări sprijină ipoteza unei componente activatorii a căilor opioide descendente spinale [13].

Alte studii prezintă acțiunea sa asupra TRPA1 spinal, care sunt considerați printre declanșatorii cei mai importanți ai durerii la nivel spinal. Metaboliții acetaminofenului activează TRPA1 nativ și reduc curenții voltaj-dependenți de calciu și sodiu din neuronii aferenți primari, astfel inducând un efect analgezic [1].

Un alt mecanism analgezic al acetaminofenului este realizat prin inhibarea captării de anandamidă și alți endocanabinoizi din spațiul extracelular. Aceste date par a sugera că și modularea sistemului endocanabinoizilor ar putea să fie un mecanism suplimentar care să medieze efectele antinociceptive sinergice ale combinațiilor acetaminofenului [10].

Carbamazepina este un medicament cu acțiune anticonvulsivantă, util în diferite forme de epilepsie, dar care în ultima vreme este util în clinică în anumite tipuri de durere, cum ar fi nevralgia de trigemen [16].

Medicamentul își explică acțiunea prin blocarea canalelor de Na. Se cunosc mai multe subtipuri notate cu Na_v 1.1 până la 1.9. Na_v1.7, 1.8 și 1.9 sunt exprimați numai la nivelul neuronilor senzoriali periferici și se consideră că sunt implicați atât în inițierea durerii acute cât și în menținerea hiperalgeziei inflamatorii postelzionale. Canalele Na_v 1.4, 1.6, 1.7, sunt sensibile la tetrodotoxină (TTX), în vreme ce Na_v 1.5, 1.8, 1.9, sunt rezistenți la aceasta [7-9].

Subtipul Na_v 1.7 este exprimat în mod semnificativ în neuronii din ganglionul rădăcinii posterioare (GRP) în neuronii simpatici și mienterici, în vreme ce Na_v 1.8 sunt este exprimat preferențial în GRP și în ganglionul Gasser.

Este bine documentată implicația sa în durerea inflamatorie și în durerea indusă de stimul rece [4]. Este cunoscut faptul că

subtipul $Na_v1.7$ este sensibil la carbamazepina și de asemenea că mutațiile sale produc o serie de sindroame dureroase ereditare [11].

$Na_v1.9$ este exprimat în neuronii senzoriali și în sistemul nervos enteric, mai ales în neuroni de dimensiuni mici cu proprietăți nociceptive.

În lumina acestor cunoștințe $Nav1.7$, 18 , și 19 ar putea fi ținte importante pentru analgezice [7].

Concluzii

Sinergismul obținut în cercetările din prezenta lucrare se poate explica prin mecanismele de acțiune specifice fiecărei substanțe.

De obicei efecte sinergice se obțin când se combină două medicamente ce prezintă cel puțin un mecanism de acțiune diferit.

În cazul carbamazepinei și acetaminofenului, există mai multe mecanisme în lucru, care ar putea concura pentru obținerea unui astfel de efect evident:

- Carbamazepina blochează canalele ionice implicate în generarea și transportul senzațiilor nociceptive la nivelul nervului spinal și al măduvei spinării ;
- Acetaminofenul ar putea inhiba generarea locală de mediatori inflamatori prin presupusa sa inhibiție a COX;
- Poate inhiba generarea de potențiale de Na/Ca la nivelul neuronilor nociceptivi senzoriali primari prin activarea TRPV; poate modula căile spinale endocanabinoide, astfel reducând transmisia durerii la nivel spinal.

În orice caz acetaminofenul (paracetamolul) pare a rămâne un analgezic puternic și ar putea să se bucure de o nouă perioadă de glorie ca membru în diverse combinații medicamentoase cu proprietăți

analgezice mai puternice și utilizabile în mai multe tipuri de durere.

Bibliografie

1. **Andersson DA, Gentry C, Alenmyr L, Killander D, Lewis SE, Andersson A, Bucher B, Galzi JL, Sterner O, Bevan S, Hogestatt ED, Zygmunt PM** (2011). TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Nat Commun*, 2, 551.
2. **Bujalska M** (2004a). Effect of nitric oxide synthase inhibition on antinociceptive action of different doses of acetaminophen. *Pol J Pharmacol*, 56(5), 605-610.
3. **Bujalska M** (2004b). Effect of nonselective and selective opioid receptors antagonists on antinociceptive action of acetaminophen [part III]. *Pol J Pharmacol*, 56(5), 539-545.
4. **Cummins TR, Rush AM** (2007). Voltage-gated sodium channel blockers for the treatment of neuropathic pain. *Expert Rev Neurother*, 7(11), 1597-612.
5. **Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Veiga FH, Ferreira SH** (1999). Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. *Br J Pharmacol*, 126(1), 45-50.
6. **Cunha TM, Verri WA, Jr, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH** (2005). A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(5), 1755-1760.
7. **Dib-Hajj S, Black JA, Cummins TR, Waxman SG** (2002). $NaN/Nav1.9$: a sodium channel with unique properties. *Trends Neurosci*, 25(5), 253-259.
8. **Dib-Hajj SD, Binshtok AM, Cummins TR, Jarvis MF, Samad T, Zimmermann K** (2009a). Voltage-gated sodium channels in pain states: role in pathophysiology and targets for treatment. *Brain Res Rev*, 60(1), 65-83.
9. **Dib-Hajj SD, Black JA, Waxman SG** (2009b). Voltage-gated sodium channels: therapeutic targets for pain. *Pain Med*, 10(7), 1260-1269.
10. **Hama AT, Sagen J** (2010). Cannabinoid receptor-mediated antinociception with acetaminophen drug combinations in rats

- with neuropathic spinal cord injury pain. *Neuropharmacology*, 58(4-5), 758-766.
11. **Lee KP, Jun JY, Chang IY, Suh SH, So I, Kim KW** (2005). - TRPC4 is an essential component of the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in mouse visceral smooth muscle cells. *Mol Cells*, 20(3), 435-441.
 12. **Pettipher ER, Hibbs TA, Smith MA, Griffiths RJ** (1997). Analgesic activity of 2-amino-4-methylpyridine, a novel NO synthase inhibitor. *Inflamm Res*, 46 Suppl, 2, S135-136.
 13. **Raffa, R.B. 2001**. Pharmacology of oral combination analgesics: rational therapy for pain. *J Clin Pharm Ther*, 26(4), 257-264.
 14. **Raffa RB, Walker EA, Sterious SN** (2004). Opioid receptors and acetaminophen (paracetamol). *Eur J Pharmacol*, 503(1-3), 209-210.
 15. **Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ** (2000). Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol*, 387(1), 111-118.
 16. **Siniscalchi A, Gallelli L, Avenoso T, Squillace A, De Sarro G** (2011). Effects of carbamazepine / oxycodone coadministration in the treatment of trigeminal neuralgia. *Ann Pharmacother*, 45(6), e33.
 17. **Tallarida RJ** (2001). Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther*, 298(3), 865-872.
 18. **Tallarida RJ** (2002). The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain*, 98(1-2), 163-8.
 19. **Tallarida RJ, Cowan A, Raffa RB** (2003). - Antinociceptive synergy, additivity, and subadditivity with combinations of oral glucosamine plus nonopioid analgesics in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 307(2), 699-704.
 20. **Turner RA, Hebborn P** (1965). *Screening methods in pharmacology*. Academic Press, New York, USA.
 21. **Vale ML, Marques JB, Moreira CA, Rocha FA, Ferreira SH, Poole S, Cunha FQ, Ribeiro RA** (2003). Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(1), 102-108.
 22. **Watkins LR, Maier SF, Goehler LE** (1995). Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain*, 63(3), 289-302.
 23. **Zimmermann M** (1986). -Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand*, 128(Suppl. 554), 221-33.

În războiul cu paraziții, el nu ia prizonieri. Îi anihilează!

pentru
câini și pisici



PARAKILL

antiparazitar extern



• Soluție spot-on pe bază de fipronil, un puternic insecticid cu spectru larg care blochează sinapsele la nivelul sistemului nervos central

• Din cauza hiperexcitării nervilor și mușchilor insectelor, acestea mor



Se administrează:

• 1 picătură / kg g.v. la animalele de talie mică

• 2 picături / kg g.v. la animalele de talie mare



Grafică: stănicu.catalina@gmail.com

Romvac
Company

Evaluarea potențialului antinociceptiv a valproatului de sodiu la șoarece

Evaluation of the antinociceptive potential of sodium valproate in mice

Lidia Cristina Chițac¹, S. Beșchea^{2*}, Monica Neamțu¹, Delia Bulea¹, Veronica Bild¹

¹Department of Pharmacodynamics and Clinical Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, „Grigore. T. Popa” Iași

²Department of Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, USAMV Iași

* Corresponding author

Cuvinte cheie: acid valproic, efect antinociceptiv, edem inflamator, răspuns constrictiv abdominal

Key words: valproic acid, antinociceptive effect, inflammatory edema, abdominal constrictive response

Rezumat

Cercetările din ultimii ani în domeniul algeziologiei au demonstrat existența mai multor tipuri de durere cu mediație complexă ceea ce a atras utilizarea unor compuși din alte clase decât analgezicele clasice pentru tratamentul durerii. Scopul acestei lucrări este de a demonstra acțiunea antinociceptivă a valproatului de sodiu. În prezenta lucrare se utilizează trei modele de nocicepție care utilizează stimul chimic, termic și presiune și un model de inflamație acută indusă prin carrageenan. S-a lucrat pe șoareci albi masculi, Swiss cu greutate cuprinse între 20-30 g. Administrarea valproatului s-a efectuat pe cale orală prin administrarea unor secvențe de doze în progresie geometrică. În urma analizei statistice s-au obținut valori DE₅₀ ale valproatului de sodiu pentru fiecare model de nocicepție după cum urmează: DE₅₀ = 21.773 ± 6.786 mg/kg pentru modelul de nocicepție cu Zymosan A, DE₅₀ = 11.807 ± 4.035 mg/kg, pentru testul Hot plate, DE₅₀ = 19.247 ± 2.207 mg/kg pentru testul Randall-Sellitto. Acțiunea valproatului se explică prin inhibarea citokinelor proinflamatoare de tip TNF-alfa, IL1, beta, IL6 și a mediatorilor de tip PGE2. Experimentele s-au efectuat în accord cu legislația în vigoare în ceea ce privește lucrul cu animalele de laborator.

Abstract

Recent research in the field of algesiology demonstrated the existence of several types of pain, with complex mediation cascades. This fact prompted the use of compounds from other drug families than classical analgesics for the treatment of pain. The purpose of this paper is to demonstrate the antinociceptive action of sodium valproate in mice. This investigation relies on three nociception models that use chemical, thermal, mechanical (pressure) stimuli, and a model of acute inflammation induced by carrageenan. The investigations were made using male white Swiss mice, weighing 20-30 grams. Valproate administration has been made orally, using geometric progression dose sequences. According to the statistical analysis, we obtained values of ED₅₀ for sodium valproate for each nociception model as follows: ED₅₀ = 21.773 ± 6.786 mg/kg for the nociception model with Zymosan A, ED₅₀ = 11.807 ± 4.035 mg/kg, for the hot plate test, ED₅₀ = 19.247 ± 2.207 mg/kg for the Randall-Sellitto test. The action of the valproate is explained by the inhibition of pro-inflammatory cytokines like TNF-α, IL1β, IL6 and prostaglandin mediators like PGE2. The experiments were made according to the European and Romanian legislation that concerns working with lab animals.

Introducere

În ultimii ani durerea a fost privită nu doar ca simptom ci ca o boală în sine. Cercetările în domeniul algeziologiei s-au extins și au adus în discuție existența mai

multor tipuri de durere cu mediație complexă.

Având în vedere neuromediatorii implicați, cercetătorii au căutat noi posibilități terapeutice în tratamentul durerii.

Medicamente din alte clase decât analgezicele opioide și nonopioide sau

antiinflamatoare nesteroidiene (AINS) și-au dovedit acțiunea analgezică singure (antidepresive triciclice, anticonvulsivante) sau în asociere cu alte substanțe.

O serie de anticonvulsivante cum ar fi carbamazepina sau acidul valproic sunt utile în nevralgia de trigemen sau durerea neuropată [14].

În lucrarea de față se tentează demonstrarea acțiunii antinociceptive a valproatului de sodiu, la șoarece, printr-o serie de modele de nocicepție care implică diferite mediații.

1. Material si Metoda

Studiul s-a realizat de șoareci masculi Swiss (Sursa Institutul Cantacuzino București) cu greutatea 20-30 g. Animalele au fost plasate în cuști de plexiglas, prevăzute cu adăpător.

Condițiile de habitat s-au realizat în incinta laboratorului de Farmacodinamie experimentală din cadrul disciplinei de Farmacodinamie și Farmacie clinică, UMF „Grigore T. Popa” Iași, într-o cameră cu temperatură și umiditate controlată (21°C ± 2°C), și un ciclu de lumină / întuneric, 12ore / 12 ore (07.00 AM / 07.00 PM).

Animalele au primit *ad libitum* apă și hrană standard (Biobaza Baneasa).

Testările au fost efectuate în începând cu orele 10.00 AM iar cu 3 ore înainte de testari s-a sistat accesul la hrană și apă.

Toate procedeele experimentale utilizate în realizarea acestui studiu au fost în strânsă concordanță cu normele specifice aprobate în UMF „Grigore T. Popa” și reglementările bioetice internaționale referitoare la experiențele realizate pe animale de laborator [18].

În aceste studii pentru demonstrarea acțiunii antinociceptive s-a utilizat:

- valproatul de sodiu (Sigma),
- Zymosan A (Sigma),
- Carrageenan lambda (Sigma),
- CMC-Na (Sigma), si
- ser fiziologic (Zentiva).

Cercetările nociceptive au avut la bază stimul chimic, termic, mecanic după cum urmează: **Testul răspunsului constrictiv abdominal** (metoda lui Siegmund și col. 1957, tehnica lui Koster și col. 1959) indus prin Zymosan A, constă în administrarea intraperitoneală a unei suspensii de Zymosan A în doză de 40mgkg⁻¹.

Se înregistrează numărul de răspunsuri constrictive abdominale timp de 12 minute după administrarea agentului iritant [13].

Interpretarea datelor a fost de tip cuantal caracterizată de prezența sau absența răspunsului calculându-se efectul maxim posibil după formula:

$$\% \text{ (antinocicepție) inhibiție} = (\text{nr. non-responderi} / \text{nr total de animale}) \times 100 \text{ [11].}$$

Testul Hot plate (metoda lui Woolfe și Mac Donald (1944) modificată de Eddy și Laborit (1953), are la bază aplicarea stimulului termic (52.5°C), timp de 30 secunde (*cut off*) pe fata plantară a șoarecelui [4].

Se utilizează aparatul Hot plate 7280 Ugo Basile prevăzut cu sistem de menținere a temperaturii constante și măsurării timpului de expunere la stimulul termic. Interpretarea datelor a fost de tip gradat [11].

S-a apreciat efectul antinociceptiv prin formula:

$$\% \text{ (antinocicepție) inhibiție} = (T_x - T_0) / (T_m + T_0) \times 100$$

Unde: T₀ – latența răspunsului măsurată înainte de administrarea substanței de studiat, T_x – latența la diferite intervale de timp consecutive administrării substanței, T_m – timpul maxim permis (*cut-off time*).

Testul Randall - Selitto permite evaluarea durerii în condiții inflamatorii și constă în aplicarea unui stimul mecanic pe laba inflamată a animalului (*cut-off* 250g) edemul obținându-se prin injectarea subcutanată în regiunea plantară a unei suspensii saline 3% de carrageenan lambda la șoarece [4].

Se utilizează analgezimetrul Ugo Bazile 37215. Interpretarea datelor a fost de tip

gradat. Efectul antinociceptiv s-a apreciat prin formula:

$$\% \text{ (antinocicepție) inhibiție} = \frac{(g_x + g_0)}{(g_x - g_0)} \times 100$$

Unde: g_0 – latența răspunsului măsurată înainte de administrarea substanței de studiat, g_x – latența la diferite intervale de timp consecutive administrării substanței, g_m – greutatea maximă permisă (cut-off).

Evaluarea edemului inflamator a labei la șoarece se realizează prin măsurarea volumului labei inflamate obținut prin administrarea subcutanată în regiunea plantară unei suspensii saline de 3% carrageenan lambda la șoarece [5, 13]. Se utilizează pletismometrul 7200 Ugo Basile.

Gradul de inhibiție a edemului inflamator s-a calculat după formula:

$$\% \text{ inhibiție} = \frac{(M-T)}{M} \times 100$$

Unde: M- valoarea gradului de inhibiție a lotului martor, T- valoarea gradului de inhibiție a lotului tratat

Analiza statistică a datelor.

Pentru a studia relațiile între doză și efect, protocolul de lucru impune trasarea

dreptelor de regresie și analiza lor pentru ambele tipuri de efecte iar pentru măsurarea relației dintre cele două variabile (doza-efect) se utilizează coeficientul de corelație Perason „R”.

Pentru evaluarea potențialului antinociceptiv, de va calcula valoarea dozei eficace 50 (DE50) din efectul maxim posibil măsurat.

În analiza statistică pentru toate testele de semnificație statistică, s-a considerat că pentru valori $P < 0,05$ există o diferență semnificativă statistic între grupele comparate (ANOVA Test).

Rezultate si discutii

Prin administrarea pe cale orală, de doze succesive cuprinse între 5.00 - 40.00 mg/kgc⁻¹, în progresie geometrică, a unei suspensii de valproat de sodiu in CMC-Na 0,1% s-a obținut pentru testul răspunsului constrictiv abdominal un efect maxim posibil antinociceptiv de 80.00%. (Tabelul 1).

Tabelul 1

Evaluarea potențialului antinociceptiv al valproatului de sodiu

Model de nocicepție	Valproat de sodiu mg/kg p.o	EMP (%)	Parametri statistici
Testul răspunsului constrictiv abdominal	40.00	80.00	ED50 = 21.773 +/- 6.786 Eqn: Y = 1.943 + 2.285*X, R: 0.921 True Confidence Limits (11,338,115.64) log(1.055,2,063)
	20.00	50.32	
	10.00	33.33	
	5.00	0.00	
Testul Hot plate	20.0	81.32	ED50 = 11.807 +/- 4.035 Eqn: Y = -29.880 + 74.504*X, R: 0.887 True Confidence Limits (11.685,2.169) log(1.068,0.336) ANOVA d.f.(1,2) F(calc): 17.379, F(tab): 18.51
	10.00	26.32	
	5.00	16.00	
	2.50	10.13	
Testul Randall Sellitto	40.00	65.4	ED50 = 19.247 +/- 2.207 Eqn: Y = -30.126 + 62.386*X R: 0.982 True Confidence Limits (12.044, 42.916) log(1.081,1.633) ANOVA d.f.(1,2) F(calc): 52.776, F(tab): 18.51
	20.00	56.4	
	10.00	34.8	
	5.00	10.23	
Edemul inflamator al labei	40.00	48.95	ED50 = 45.753 +/- 6.964 Eqn: Y = -4.579 + 32.870*X, R: 0.989 True Confidence Limits (20.097,10.854) log(1.303,1.036) F(calc): 43.285, F(tab): 161.4
	20.00	36.45	
	10.00	29.16	

Datele obținute în tabelul 1 au permis trasarea dreptei de regresie pentru determinarea valorii DE 50 a valproatului de

sodiu pentru modelele de nocicepție studiate (Figurile 1 - 4). Din analiza dreptei de regresie (Fig 1) și tabelul 1 se observă că s-

a putut pune în evidență efectul antinociceptiv al valproatului de sodiu ($DE_{50} = 21.773 \pm 6.786$) în modelul de nociceptie cu Zymosan A.

Testul răspunsului constrictiv abdominal permite aprecierea analgeziei centrale și periferice.

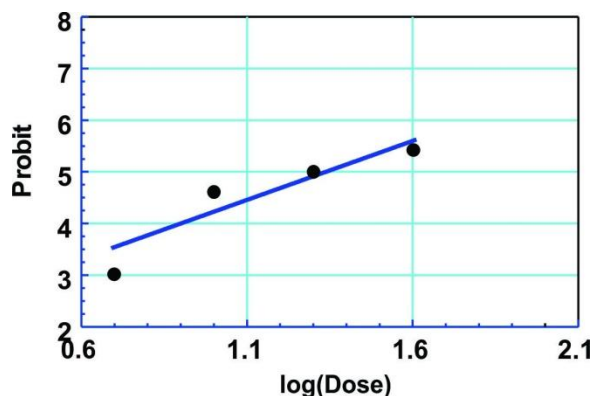


Fig. 1 Dreapta de regresie pentru stabilirea DE_{50} a valproatului de sodiu pentru testul răspunsului constrictiv abdominal

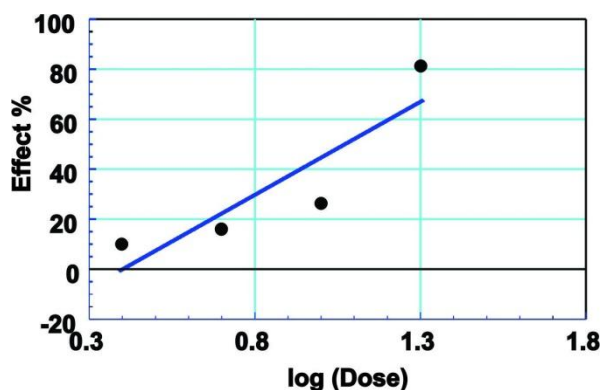


Fig. 2 Dreapta de regresie pentru stabilirea DE_{50} a valproatului de sodiu pentru testul Hot plate

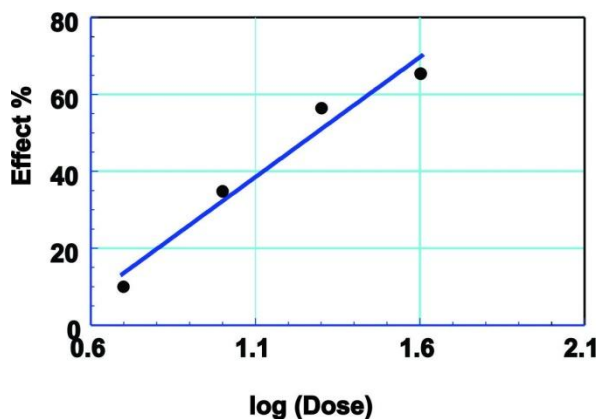


Fig. 3 Dreapta de regresie pentru stabilirea DE_{50} a valproatului de sodiu pentru testul Randall Selitto

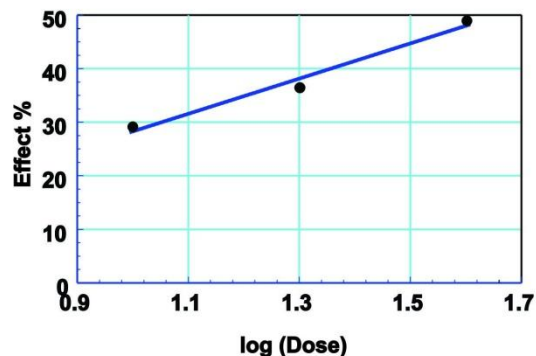


Fig. 4 Dreapta de regresie pentru stabilirea DE_{50} a valproatului de sodiu pentru evaluarea gradului de inhibiție a edemului inflamator.

Unii autori au arătat că prin administrarea intraperitoneală de Zymosan A, la șoarece, apare un răspuns inflamator, caracterizat prin răspuns constrictiv abdominal, extravazare de plasmă, infiltrare leucocitară și biosinteză de eicosanoide (Doherty cit Pettipher, 1997) [7].

Spre deosebire de răspunsul constrictiv abdominal produs prin administrarea intraperitoneală de acid acetic, administrarea de zymosan nu produce necroză celulară, în consecință poate fi mult mai relevant pentru patogeneza durerii inflamatoare [7, 14].

În ultimul timp s-a pus în evidență că agenții inflamatori nu stimulează direct eliberarea de mediatori primari hipemociptivi, ci că eliberarea lor este precedată de o cascadă de citokine [8].

S-a pus în evidență că, la șoarece, răspunsul constrictiv abdominal la zymosan și acid acetic este mediat prin TNF-alfa, IL1-beta și IL8, care acționează concomitent și sinergic (Ribiero cit Cunha, 2005) [1].

Mecanismul de acțiune al acidului valproic constă în inhibarea GABA-transaminazei, enzimă responsabilă de degradarea GABA și creșterea activității acid glutamic decarboxilazei, acționând indirect pe GABA [16]. Literatura de specialitate aduce în evidență și alte mecanisme de acțiune posibile care ar putea contribui la efectul antinociceptiv (atenuarea mediației excitatorii prin NMDA, blocarea canalelor de Na, Calciu voltaj dependente (tip L, C, D, N,

F, T) și canalelor de potasiu voltaj dependente) [3, 9, 15]. Alte studii demonstrează că acidul valproic reduce numărul de leucocite, și eliberarea de mieloperoxidaza în exudatul peritoneal în modelul de peritonită cu carrageenan care produce un răspuns inflamator cu infiltrat de neutrofile implică exudare de plasmă migrare celulară și eliberare de mediatori de tipul NO, PGE2, IL-1 beta, IL-6, TNF-alfa [10, 16].

Din analiza dreptei de regresie (Fig 3) și tabelul 1 se observă că s-a putut pune în evidență efectul antinociceptiv al valproatului de sodiu ($DE_{50} = 19.247 \pm 2.207$) pentru modelul de nocicepție inflamatorie indus prin carrageenan. Studii recente demonstrează efectul antinociceptiv și antiinflamator al valproatului de sodiu asupra edemului labei indus prin carrageenan [16].

Nu s-a putut determina o valoare DE_{50} pentru inhibiția edemului inflamator pentru secvența de doze luată în studiu (Tabelul 1).

Valoarea $DE_{50} = 11.807 \pm 4.035$ mg/kg⁻¹ (Tabelul 1, Fig. 2) obținută pentru testul Hot plate se poate explica prin intervenția acidului valproic asupra canalelor de sodiu din neuronii ganglionului rădăcinii posterioare (GRP) a nervului spinal, incluzând inhibiția indirectă a canalelor de sodiu lente și a canalelor de rectificare depolarizantă a membranei [12], precum și a curenților de calciu [2].

Astfel se poate presupune o inhibiție spino-corticală directă, datorată efectului inhibitor asupra descărcărilor de înaltă frecvență de potențiale de acțiune care sunt implicate direct în percepția durerii [6]. Până la ora actuală rezultatele obținute de noi sunt primele care prezintă un astfel de efect al acidului valproic pe un model de durere termică acută de tipul Hot plate.

Concluzii

Având în vedere mediația comună pentru cele două modele de nocicepție edemul inflamator al labei indus prin carrageenan și răspunsul constrictiv

abdominal indus prin Zymsan A, valorile DE_{50} apropiate și parametri statistici rezultați sugerăm că inhibiția nocicepției în durerea inflamatorie produsă de valproatul de sodiu ar putea fi explicată prin inhibarea citokinelor proinflamatoare de tip TNF-alfa, IL1 beta, IL6 și a mediatorilor de tip PGE2.

De asemenea am demonstrat un efect antinociceptiv direct al valproatului de sodiu pe modelul de nocicepție termică acută.

Bibliografie

1. **Cunha TM, Verri WA Jr, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH** (2005). A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(5), 1755-1760.
2. **De Sarro G, Ascoti C, di Paola ED, Vidal MJ, De Sarro A** (1992). Effects of antiepileptic drugs, calcium channel blockers and other compounds on seizures induced by activation of voltage-dependent L calcium channel in DBA/2 mice. *Gen Pharmacol*, 23(6), 1205-1216.
3. **Diederich K, Koch M** (2005). Role of the pedunculopontine tegmental nucleus in sensorimotor gating and reward-related behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, 179(2), 402-408.
4. **Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW** (2001). Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*, 53(4), 597-652.
5. **Levy L** (1969). Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Sci*, 8(11), 601-606.
6. **McLean MJ, Macdonald RL** (1986). Sodium valproate, but not ethosuximide, produces use- and voltage-dependent limitation of high frequency repetitive firing of action potentials of mouse central neurons in cell culture. *J Pharmacol Exp Ther*, 237(3), 1001-1011.
7. **Pettipher ER, Hibbs TA, Smith MA, Griffiths RJ** (1997). Analgesic activity of 2-amino-4-methylpyridine, a novel NO synthase inhibitor. *Inflamm Res*, 46 Suppl 2, S135-136.
8. **Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ** (2000). Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing

- nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol*, 387(1), 111-118.
9. **Rosenberg G** (2007). The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? *Cell Mol Life Sci*, 64(16), 2090-2103.
 10. **Salvemini D, Wang ZQ, Bourdon DM, Stern MK, Currie MG, Manning PT** (1996). Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. *Eur J Pharmacol*, 303(3), 217-220.
 11. **Tallarida RJ, Cowan A, Raffa RB** (2003). Antinociceptive synergy, additivity, and subadditivity with combinations of oral glucosamine plus nonopioid analgesics in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 307(2), 699-704.
 12. **Tian LM, Alkadhi KA** (1994). Valproic acid inhibits the depolarizing rectification in neurons of rat amygdala. *Neuropharmacology*, 33(10), 1131-1138.
 13. **Turner RA, Hebborn P** (1965). *Screening methods in pharmacology*. Academic Press, New York, USA.
 14. **Vale ML, Marques JB, Moreira CA, Rocha FA, Ferreira SH, Poole S, Cunha FQ, Ribeiro RA** (2003). Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(1), 102-108.
 15. **Willmore LJ** (2003). Divalproex and epilepsy. *Psychopharmacol Bull*, 37 Suppl. 2, 43-53.
 16. **Ximenes JC, de Oliveira Goncalves D, Siqueira RM, Neves KR, Santos Cerqueira G, Correia AO, Felix FH, Leal LK, de Castro Brito GA, da Graca Naffah-Mazzacorati M, Viana GS** (2013). Valproic acid: an anticonvulsant drug with potent antinociceptive and anti-inflammatory properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 386(7), 575-587.
 17. **Zakrzewska JM, Linskey ME** (2014). Trigeminal neuralgia. *BMJ*, 348, g474.
 18. **Zimmermann M** (1986). Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand Suppl*, 554, 221-233.



Distrugătorii tuturor paraziților! Pentru oi, vaci & capre!

Fasciocid

Suspensie orală, Antihelmintic

RomIvermectin 1%

Antihelmintic cu spectru larg, Acaricid

RomAvermectin B₁ 1% Plus

Trematocid, nematocid, acaricid, insecticid

Romfenbendazol 10%

Suspensie orală, Antihelmintic

Rombendazol 2,5%

Suspensie orală, Antihelmintic cu spectru larg

Rombendazol 10%

Suspensie orală, Antihelmintic cu spectru larg

Rombendazol Plus

Suspensie orală, Antihelmintic cu spectru larg

Levamisol

Soluție injectabilă, Antihelmintic cu spectru larg



Niciun parazit cu



Genetica: statkou.ustaline@gmail.com



Romoxibendazol
Antihelmintic cu spectru larg



Levamisol
Soluție injectabilă
Antihelmintic cu spectru larg



RomIvermectin 1%
Antihelmintic cu spectru larg
Acaricid

Te uiți după paraziți?
Te uiți degeaba!

Romparasect 5%

Soluție concentrată
Acaricid & insecticid
Grupa principală 3,
tip de produs 18



Scabizol

Soluție concentrată (alcoolică)
Insecticid
Grupa principală 3,
tip de produs 18