

REZUMAT

Teza de doctorat, elaborată în limba română cu titlul "INVESTIGAREA EFECTELOR TOXICOLOGICE ALE ÎNDULCITORILOR ȘI FUNGICIDELOR TRIAZOLICE" prezintă predicții cu privire la efectele îndulcitorilor non-intensivi și intensivi asupra sănătății umane, respectiv la efectele fungicidelor triazolice asupra mediului și asupra sănătății umane. Pentru a obține aceste predicții au fost utilizate în special metode computaționale. Au fost aleși pentru studiu îndulcitorii și fungicidele triazolice datorită faptului că aceste substanțe sunt utilizate în cantități mari în industria alimentară și respectiv în practicile agricole.

Prezenta teză este structurată în 2 părți:

Prima parte, STUDIU DE LITERATURĂ, cuprinde două capitole, *Noțiuni generale despre îndulcitori și efectele cunoscute ale acestora asupra sănătății umane și respectiv Fungicide triazolice - utilizare și efecte cunoscute asupra mediului înconjurător și asupra sănătății umane*. Această parte cuprinde definirea termenilor și sintetizează informații din literatura de specialitate cu privire la efectele cunoscute ale xenobioticelor studiate asupra sănătății umane și asupra mediului înconjurător. Datele sintetizate în această primă parte au făcut obiectul a două articole de sinteză publicate în reviste indexate WOS: (1) Roman, D.L., Voiculescu, D.I., Ostafe, V., Ciorsac, A., Isvoran, A.. (2022). *A review of the toxicity of triazole fungicides approved to be used in European Union to the soil and aqueous environment, Ovidius University Annals of Chemistry*, 33(2): 113-120. IF=0 (Q4) <https://doi.org/10.2478/auoc-2022-0017>; (2) Roman, D.L., Voiculescu, D.I., Ostafe, V., Ciorsac, A., Isvoran, A.. (2022). *A review of the toxicity of triazole fungicides approved to be used in European Union to the soil and aqueous environment, Ovidius University Annals of Chemistry*, 33(2): 113-120. IF=0 (Q4) <https://doi.org/10.2478/auoc-2022-0017>.

A doua parte, STUDII ORIGINALE, descrie xenobioticele studiate, bazele de date și metodele computaționale utilizate în vederea realizării acestui studiu, respectiv prezintă rezultatele obținute, care sunt discutate în contextul cunoștințelor actuale din domeniul abordat. Partea de *Rezultate și discuții*, expune rezultatele studiilor realizate în cadrul acestei teze de doctorat și care sunt conținute în 3 subcapitole:

1. Profilurile ADMET, farmacocinetica și efectele adverse ale îndulcitorilor naturali și intensivi.

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu arată că îndulcitorii naturali investigați au profiluri farmacocinetice favorabile, deoarece nu sunt capabili să afecteze sistemul nervos central, nu sunt considerați ca fiind inhibitori ai citocromilor P450 implicați în metabolismul xenobioticelor și nu au capacitatea de a pătrunde prin piele. Rezultatele care vizează capacitatea slabă a îndulcitorilor naturali de a pătrunde în piele sunt importante pentru cei care lucrează în fabrici care produc, ambalează sau folosesc acești îndulcitori, deoarece sunt expuși profesional și pot fi contaminați usor. Dintre compușii analizați, se estimează că steviolul are cel mai mare efect de perturbare endocrină, fiind capabil să se lege la receptorii de androgeni, estrogeni, mineralocorticoizi și tiroidieni și există o probabilitate mare de a produce un efect antagonist asupra receptorului de androgeni. Această predicție este în acord cu datele experimentale care ilustrează faptul că steviolul, un compus cu o structură steroidă, produce perturbări endocrine la om. Celelalte efecte secundare anticipate ale îndulcitorilor analizați sunt: nefrotoxicitatea, hipotensiunea, tulburările de comportament. Glicirizina, neospiridina și advantamul sunt îndulcitorii care ilustrează potențial de blocare a canalului h-ERG, se consideră că acesulfamul de potasiu, ciclamătii și zaharina pot produce leziuni oculare și cutanate, iar neospiridina, acesulfamul de potasiu, advantamul, aspartamul și zaharina pot produce hepatotoxicitate. Cu excepția potențialului de iritare a ochilor și a pielii al acestor compuși, celelalte efecte secundare nu au fost confirmate de datele experimentale obținute de la subiecți umani. Alte efecte toxicologice identificate au fost efectele mutagene și carcinogenitatea genotoxică a acesulfamului de potasiu și a sucralozei, efectul genotoxic al acesulfamului de potasiu asupra oamenilor fiind de asemenea constatat experimental. Acest studiu a fost valorificat prin publicarea unui articol într-o revistă BDI: *Voiculescu, D.I., Ostafe, V., Ciorsac A., Isvoran A, Prediction of biological effects of some natural sweeteners, New Frontiers in Chemistry, 2020, 29(1):1-11.*

Într-un alt studiu am luat în considerare următorii îndulcitori naturali: glucoza, fructoza, galactoza, zaharoza și maltoza, precum și îndulcitori intensivi naturali (D-tagatoza, glicirizina, neospiridina, steviolul) și sintetici (advantamul, acetulfat potasiul, aspartamul, acidul ciclamic, ciclamatul de sodiu, ciclamatul de potasiu, ciclamatul de magneziu, ciclamatul de calciu, neutamul, zaharina și sucraloza) care sunt regașiți în multe produse alimentare. Ulterior am realizat profilurile ADMET, am prezis farmacocinetica și efectele adverse ale acestora asupra sănătății umane. În

urma acestora am concluzionat faptul că glicirizina, neospiridina și advantamul sunt îndulcitorii care ilustrează potențial de blocare a canalului h-ERG, se consideră că acesulfamul de potasiu, ciclamatii și zaharina pot produce leziuni oculare și cutanate, iar neospiridina, acesulfamul de potasiu, advantamul, aspartamul și zaharina pot produce hepatotoxicitate. Cu excepția potențialului de iritare a ochilor și a pielii al acestor compuși, celelalte efecte secundare nu au fost confirmate de datele experimentale obținute de la subiecți umani. Alte efecte toxicologice identificate au fost efectele mutagene și carcinogenitatea genotoxică a acesulfamului de potasiu și a sucralozei, efectul genotoxic al acesulfamului de potasiu asupra oamenilor fiind de asemenea constatat experimental. Dintre compușii analizați, se estimează că steviolul are cel mai mare efect de perturbare endocrină, fiind capabil să se lege la receptorii de androgeni, estrogeni, mineralocorticoizi și tiroidieni și există o probabilitate mare de a produce un efect antagonist asupra receptorului de androgeni. Această predicie este în acord cu datele experimentale care ilustrează faptul că steviolul, un compus cu o structură steroidă, produce perturbări endocrine la om. Celelalte efecte secundare anticipate ale îndulcitorilor analizați sunt: nefrotoxicitatea, dermatoza, hipotensiunea, pierderea în greutate, tulburările de comportament. . Acest studiu a făcut obiectul unui articol publicat într-o revistă indexată WOS: *Voiculescu, D.I., Ostafe, V., Isvoran, A. (2021). Computational assessment of the pharmacokinetics and toxicity of the intensive sweeteners, Farmacia, 69(6), 1032-1041. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2021.6.3>, FI 1,55.*

2. Stereospecificitatea efectelor difenoconazolului asupra sănătății umane.

În acest studiu am luat în considerare cei patru stereoizomeri ai fungicidului triazolic difenoconazol: (2R,4S)-difenoconazol, (2S,4S)-difenoconazol, (2R,4R)-difenoconazol, (2S,4S)-difenoconazol. Au fost realizate profilurile ADMET ale fiecărui stereoisomer, au fost investigate efectele acestora asupra sistemului endocrin uman, s-a evaluat interacțiunea acestora cu proteinele plasmatice și citocromii umani. În urma acestui studiu, au fost identificate mai multe efecte farmacocinetice și toxicologice pentru fiecare dintre stereoizomerii difenoconazolului: legarea la proteinele plasmatiche corelată cu valoarea clearance-ului, inhibarea citocromilor, potențialul de a induce leziuni hepatice, neurotoxicitate, efecte mutagene și potențial de sensibilizare a pielii. Pe lângă aceste efecte manifestate de toți stereoizomerii, (2S,4S)-difenoconazolul a prezentat, de asemenea, o probabilitate medie de a produce cardiotoxicitate, carcinogenitate și de a afecta negativ numeroși receptorii nucleari. Aceste efecte ale (2S,4S)-difenoconazolului sunt în corelație

cu valoarea medie a clearance-ului. Rezultatul studiului a fost, de asemenea, în acord cu literatura de specialitate, date care evidențiază bioactivitatea distinctă a stereoizomerilor difenoconazolului și cea mai mare toxicitate exercitată asupra mediului a izomerului (2S,4S) –difenoconazol. Acest studiu poate fi considerat o investigație experimentală care să evaluateze posibilele efecte toxice ale acestor inducitori. Studiul a făcut obiectul unui articol publicat într-o revistă indexată WOS: *Voiculescu, D.I., Roman, R.L., Ostafe, V., Isvoran, A. (2022). A Cheminformatics Study Regarding the Human Health Risks Assessment of the Stereoisomers of Difenoconazole, Molecules, 27(15):4682.* <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/15/4682>, FI 4,927.

3. Stereospecificitatea efectelor triticonazolului asupra sănătății umane și asupra activității solului

În acest studiu s-au luat în considerare stereoizomerii fungicidului triazolic triticonazol: (R)- triticonazol și (S)- triticonazol. S-au realizat profilurile ADMET ale celor doi stereoizomeri; efectele produse de aceștia asupra sistemului endocrin uman; s-a evaluat interacțiunea acestora cu proteinele plasmatice și citocromii umani; s-a studiat interacțiunea celor doi stereoizomeri cu enzimele găsite în sol (dehidrogenaza, ureaza și fosfataza). Datele prezentate în acest studiu au relevat că aplicarea fungicidului triticonazol pe semințele de orz și de grâu, semănate ulterior în sol de tip cernoziom, a condus, în următoarele 14 zile de la semănat, la scăderea cu 70% a DHA și la scăderea cu 40% a PhA pentru ambele tipuri de semințe, creșterea UA cu aproximativ 20% în cazul semințelor de orz și creșterea UA cu 40% în cazul semințelor de grâu. Efectele observate asupra activității enzimelor găsite în sol nu au fost dependente de doză .

Evaluarea efectelor izomerilor triticonazolului asupra enzimelor din sol prin andocare moleculară a reliefat că ambii izomeri sunt capabili să se lege la siturile active ale dehidrogenazelor investigate.

În ceea ce privește efectele asupra sănătății umane, atât (R)- triticonazolul cât și (S)- triticonazolul relevă mai multe efecte biologice. Izomerii sunt capabili să se lege de proteinele plasmatice fiind ușor distribuți în organismul uman, pot inhiba citocromii umani responsabili de metabolismul xenobioticelor, pot conduce la cardiotoxicitate prin blocarea canalului de potasiu h-ERG și pot afecta receptorii de estrogeni, glucocorticoizi, mineralocorticoizi și receptorul β tiroidian. Au fost identificate un număr de efecte farmacocinetice și toxicologice distincte pentru fiecare dintre stereoizomerii triticonazolului. R-triticonazolul poate produce sensibilizarea pielii și

ar putea prezenta un efect antagonist scăzut asupra receptorului de androgeni. (S)-triticonazoul poate produce carcinogenitate și toxicitate respiratorie și prezintă un efect antagonist moderat asupra receptorului de androgeni. În plus, (S)-triticonazoul deține energii de interacțiune mai mari atât cu proteinele plasmatice, cât și citocromii umani. Rezultatele obținute în acest studio au fost valorificate prin publicarea unei articole într-o revistă indexată WOS: *Roman, D.L., Voiculescu, D.I., Matica, A.M., Baerle, V., Filimon, M.N., Ostafe, V., Isvoran, A. (2022). Assessment of the effects of triticonazole on the soil and on the human health. Molecules, 27(19), 6554.* <https://doi.org/10.3390/molecules27196554>, IF=4,927.

Concluziile generale ale tezei sunt:

Rezultatele obținute în cadrul studiilor efectuate în perioada sudiilor doctorale se referă la predicții cu privire la efectele unor îndulcitori naturali și sintetici intensivi asupra sănătății umane și respectiv evaluarea efectelor unor fungicide triazolice asupra mediului și asupra sănătății umane.

În cazul îndulcitorilor, rezultatele obținute reliefiază, pentru unii dintre aceștia, posibile efecte toxicologice cum ar fi perturbarea sistemului endocrin prin afectarea unor receptori nucleari, hepatotoxicitatea, cardiotoxicitatea, mutagenitatea și carcinogenitatea. Aceste predicții relevă faptul că sunt necesare mult mai multe cercetări pentru a înțelege pe deplin efectele biologice ale îndulcitorilor asupra sănătății umane. Predicțiile obținute pot fi utilizate pentru a ghida o evaluare experimentală ulterioară a utilizării în siguranță a acestor compuși chimici.

În ceea ce privește fungicidele triazolice, s-au sintetizat informațiile existente în literatura de specialitate cu privire la efectele acestora asupra activității enzimelor prezente în sol, respectiv asupra unor organisme model care trăiesc în sol și mediul apă. S-a observat că fungicidele triazolice produc de obicei inhibarea activității enzimelor prezente în sol în corelare cu efectele produse asupra populațiilor de microorganisme din sol, sunt persistente în sol și în mediul apă și manifestă toxicitate acută și cronică moderate asupra organismelor care trăiesc în sol și apă. Dintre aceste fungicide, s-a studiat experimental efectul triticonazolului care a fost aplicat asupra semințelor de grâu și orz înainte de înșământare asupra activității enzimelor din sol și s-a observat o scădere a activității acestora într-un interval de 21 de zile de la aplicare. Scăderea activității enzimelor nu a depins de doza de triticonazol utilizată, dar a fost mai accentuată în cazul solului care a conținut semințe de orz, reliefând influența tipului de cultură asupra comunității de microorganisme din sol și implicit asupra activității enzimelor.

Studiile computaționale asupra fungicideor triazolice au vizat efectele stereoizomerilor difenoconazolului asupra sănătății umane și ale stereoizomerilor triticonazolului atât asupra sănătății umane, cât și asupra enzimelor din sol. Studiile efectuate au evidențiat efecte biologice distințe ale stereoizomerilor, atât pentru cei ai difenoconazolului, cât și ai triticonazolului. Aceste activități distințe ale stereoizomerilor nu sunt de obicei luate în considerare de agențiile de reglementare, cele mai frecvente abordări de evaluare a riscurilor trec cu vederea implicațiile chiralițății asupra activității biologice a compușilor chimici și acest lucru slăbește acuratețea evaluărilor riscurilor. Stereoizomerii ar trebui tratați ca și compuși chimici diferenți atunci când sunt evaluate risurile. În acest context, evaluarea computațională a efectelor biologice ale stereoizomerilor este un instrument util, mai ales în situațiile în care informațiile referitoare la izomeri diferenți nu sunt disponibile sau sunt dificil de obținut, deoarece poate ghida experimentele și poate reduce testarea pe animale.

CUPRINS

| |
|--|
| Introducere....22 |
| PARTEA I. STUDIU DE LITERATURĂ....23 |
| Cap. I.1 Noțiuni generale despre îndulcitori și efectele cunoscute ale acestora asupra sănătății umane.....23 |
| I.1.1. Îndulcitori -noțiuni generale.....23 |
| I.1.2. Îndulcitori non-intensivi.....26 |
| I.1.3. Îndulcitori intensivi.....27 |
| Cap. I.2. Fungicide triazolice - utilizare și efecte cunoscute asupra mediului înconjurător și asupra sănătății umane.....32 |
| I.2.1. Utilizarea pesticidelor pe plan global.....32 |
| I.2.2. Fungicide. Fungicide triazolice.....33 |
| I.2.3. Efecte ale fungicidelor triazolice asupra mediului.....35 |
| I.2.4. Efecte ale fungicidelor triazolice asupra sănătății umane.....58 |
| PARTEA a II-a. STUDII ORIGINALE.....60 |
| Cap II.1. Materiale și metode utilizate în studiile aferente tezei de doctorat.....60 |
| II.1. Materiale utilizate în studiile aferente tezei de doctorat.....60 |
| II.1.1. Îndulcitori.....60 |
| II.1.2. Fungicide triazolice.....63 |
| II.2. Baze de date utilizate în prezentul studiu.....65 |
| II.2.1. Baza de date PubChem.....65 |
| II.2.2. Baza de date Pesticide Properties DataBase.....67 |
| II.3. Metode computaționale utilizate în studiile aferente tezei de doctorat.....69 |
| II.3.1 Programe care permit predicția profilurilor ADMET ale compușilor chimici69 |
| II.3.2. Programe care prezic efecte toxicologice ale substanțelor chimice asupra organelor umane....77 |
| II.3.3. Andocarea moleculară și analiza rezultatelor andocării.....83 |
| III. Rezultate și discuții.....87 |

| | |
|--|-----|
| III.1. Profilurile ADMET, farmacocinetica și efectele adverse ale îndulcitorilor..... | 87 |
| III.1.1. Profilurile ADMET, farmacocinetica și efectele adverse ale îndulcitorilor naturali.... | 87 |
| III.1.2 Profilurile ADMET, farmacocinetica și toxicitatea îndulcitorilor intensivi..... | 90 |
| III.1.3. Concluzii cu privire la profilurile ADMET, farmacocinetica și toxicitatea îndulcitorilor..... | 101 |
| III.2. Stereospecificitatea efectelor difenoconazolului asupra sănătății umane..... | 102 |
| III.2.1. Stereoizomeri ai difenoconazolului..... | 102 |
| III.2.2. Profilul ADMET al steroizomerilor difenoconazolului..... | 102 |
| III.2.3. Efectele endocrine ale steroizomerilor difenoconazolului..... | 107 |
| III.2.4. Evaluarea interacțiunii stereozomerilor difenoconazolului cu proteinele plasmatice și citocromii umani..... | 108 |
| III.2.5. Concluzii cu privire la efectele specifice ale steroizomerilor difenoconazolului asupra sănătății umane..... | 115 |
| III.3. Stereospecificitatea efectelor triticonazolului asupra sănătății umane și asupra activității solului..... | 115 |
| III.3.1. Stereoizomeri ai triticonazolului..... | 115 |
| III.3.2. Profilul ADMET al steroizomerilor triticonazolului..... | 116 |
| III.3.3. Predicția efectelor endocrine ale steroizomerilor triticonazolului..... | 118 |
| III.3.4. Evaluarea interacțiunii stereozomerilor triticonazolului cu proteinele plasmatice și citocromii umani..... | 119 |
| III.3.5. Evaluarea interacțiunii triticonazolului cu enzime găsite în sol..... | 123 |
| III.3.6. Concluzii cu privire la efectele specifice ale steroizomerilor triticonazolului asupra sănătății umane și asupra enzimelor găsite în sol..... | 134 |
| Concluzii generale..... | 135 |
| Bibliografie..... | 136 |

CUVINTE CHEIE

Îndulcitori, pesticide, fungicide, triazol, difenoconazol, triticonazol