

rilor postoperatorii ale flebohemodinamicii membrelor inferioare, însă cu un rol predictiv limitat al evoluției clinice postoperatorii în cazurile insuficienței venoase cronice avansate. În condițiile clinice menționate mai sus suprimarea doar a refluxului safenian nu va ameliora suficient hemodinamica venoasă, normalizarea acesteia survenind mult mai frecvent după asocierea întreruperii venelor perforante gambiere incompetente.

Bibliografie

1. Krijnen R.M., de Boer E.M., Bruynzeel D.P., *Epidemiology of venous disorders in the general and occupational populations*. Epidemiol. Rev., 1997; 19(2):294-309.
2. Kelechi T.J., Bonham P.A., *Measuring venous insufficiency objectively in the clinical setting*. J. Vasc. Nurs., 2008; 26(3):67-73.
3. Sarin S., Shields D.A., Scurr J.H., Coleridge-Smith P.D., *Photoplethysmography: A valuable noninvasive tool in the assessment of venous dysfunction?* J. Vasc. Surg., 1992; 16(2):154-162.
4. Illig K.A., Shortell C.K., Ouriel K., Greenberg R.K., Waldman D., Green R.M., *Photoplethysmography and calf muscle pump function after subfascial endoscopic perforator ligation*. J. Vasc. Surg., 1999; 30(6):1067-76.

Rezumat

Studiul curent reflectă rezultatele evaluării în timp a hemodinamicii venoase după suprimarea refluxului safenian și/sau perforant, utilizând fotoplethysmografia. Pe un lot de 19 pacienți (25 extremități) cu insuficiență venoasă cronică avansată s-a stabilit o rată de 16,17% de rezultate non-interpretabile ale curbei fotoplethysmografice, ce indică asupra unui rol predictiv limitat al metodei cu referință la evoluția clinică postoperatorie a patologiei venoase cronice. Totodată, prin fotoplethysmografie s-a stabilit că suprimarea izolată a refluxului safenian nu va ameliora suficient hemodinamica venoasă, normalizarea acesteia survenind mult mai frecvent după asocierea întreruperii perforantelor gambiere incompetente.

Cuvinte-cheie: Insuficiență venoasă cronică, membre inferioare, fotoplethysmografie.

Summary

Current study reflect the results of venous haemodynamic assessments after surgical removal of saphenous and/or perforator vein reflux, using photoplethysmography. Basing on small group, including 19 patients (25 extremities) with advanced chronic venous insufficiency a rate of 16,17% of non-interpretable results of photoplethysmographic curves was established, that indicate on limited predictive role of respective method concerning postoperative clinical evolution of chronic venous pathology. However, using photoplethysmography was showed that removal of saphenous reflux alone leading to insufficient improvement of venous haemodynamic, their normalization being observed more frequent after adding of perforator vein interruption.

Keywords: Chronic venous insufficiency, lower limbs photoplethysmography.

Резюме

В настоящей работе отражены результаты исследования при помощи фотоплетизмографии венозной гемодинамики нижних конечностей после хирургического устранения рефлюкса в подкожных и/или перфорантных венах. У 19 больных (25 конечностей) с тяжелой хронической венозной недостаточностью результаты фотоплетизмографии оказались неинформативными в 16,17% случаев, что свидетельствует о низкой прогностической ценности этого исследования для оценки послеоперационной эволюции хронических венозных заболеваний. В то же время, с помощью фотоплетизмографии было установлено, что изолированное устранение рефлюкса по подкожным венам не приводит к достаточному улучшению венозной гемодинамики. Нормализация показателей фотоплетизмографии чаще отмечается при сочетании стриппинга с прерыванием несостоятельных перфорантных вен.

Ключевые слова: Хроническая венозная недостаточность, нижние конечности, фотоплетизмография.

EXTRACȚIA FENOLILOR ȘI FLAVONOIDELOR DIN SPECIA CENTAUREA CYANUS L.

*Tatiana Chiru*¹, doctorand; dr. *Fabiana Antognoni*², prof. *Ferruccio Poli*², *Anatolie Nisteanu*¹, doctor în farmacie, profesor universitar

¹Catedra Farmacognozie și Botanică farmaceutică USMF „Nicolae Testemițanu”

²Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale, Università di Bologna, Bologna, Italy

e-mail: tatiana.usmf@gmail.com

Introducere

Centaurea cyanus L. este o plantă anuală, ce crește spontan în Europa și Asia de est, îndeosebi prin semănăturile de cerealiere. Costituenții chimici principali ai plantei sunt derivații flavonoidici ca: apigenina-4'-O-(6-O-malonil-glucozida)-7-O-glucuronida, apigenina-4-O-glucozida, cosmosiina, apiina, metilapigenina și metil-vitexina, centaurocianina, cianidina, rutozida, izoramnetina, izoramnetina-7-O-glucozida, naringenina și naringenina-7-O-gluco-ramnozida [4]; derivații fenilcarboxilici (acizii *cis*- și *trans*-cafeic, protocatehic și clorogenic, acizii *p*-hidroxi-benzoic, *p*-cumaric, vanilic, siringic, ferulic, salicilic, benzoic, *cis*- și *trans*-sinapic) [5]. Costituenții respectivi îi conferă plantei un spectru larg de acțiune: antiinflamator, antioxidant, imunologic, gastroprotectiv, astringent, antibacterian și antiviral [2,4,5,6]. Grație

acestor virtuți terapeutice, ne-am propus obținerea unui extract polifenolic pentru a fi utilizat ulterior la realizarea unor forme farmaceutice.

Material și metode

Produsul vegetal

Părți aeriene, flori (marginale și centrale), inflorescențe de albăstriță colectate la Centrul de Cultivare a Plantelor medicinale al USMF “Nicolae Testemițanu” Republica Moldova, mai-iulie 2006-2011 și material vegetal recoltat în luna iunie 2012 din colecția Grădini Botanice a Universității din Bologna, Italia.

Prepararea extractelor

Metoda 1

Părțile aeriene și florile (20-30 g) uscate pulverizate se extrag sub acțiunea ultrasunetului 3 ore: a) consecvent cu *n*-hexan, cloroform și metanol (3 × 10 ml/g, pentru fiecare), b) metanol, c) soluție hidroalcoolică 60%, urmată de acțiunea ultrasunetului în toate cazurile. După 24 ore de agitare continuă extractele se filtrează prin hârtia Whatman n.2 în vid, utilizând pâlnia Buchner. Extractele combinate se evaporă până la uscat la presiune redusă, temperatură de 40°C și se păstrează la -4°C până la analiză [3].

Metoda 2

Părțile aeriene (20 g) uscate și pulverizate se extrag cu diclormetan în aparatul Soxhlet, pentru înlăturarea clorofililor, lipidelor și altor compuși lipofili până la obținerea soluției puțin colorate (aprox 48 ore). Urmează extragerea timp de 20 min cu soluție hidroalcoolică 60 și 80%, sub acțiunea ultrasunetului la temperatura camerei (temperatura se menține cu ajutorul gheței) și agitare periodică. Extractul se filtrează prin hârtia Whatman n.2 în vid, utilizând pâlnia Buchner. Reziduu se reextrage de 4 ori (etanol 60 și 80%), repetând toată procedura. Solventul se evaporă la presiune redusă, temperatură de 40°C și se păstrează la -4°C până la analiză [1].

Determinarea totalului polifenolic

Conținutul totalului polifenolic în extracte de *C. cyanus* L. a fost determinat prin metoda Folin-Ciocalteu. 50 μl extract (1 μg/ml) se amestecă cu 250 μl reactiv fenolic Folin-Ciocalteu (10 x diluat), 500 μl

apă și se lasă în repaus 1 minut. Apoi se adaugă 800 μl soluție 20% Na₂CO₃, se agită și se lasă 2 ore la temperatura camerei (sau 30 min la 40°C). Absorbanța soluției se citește la 760 nm. Totalul polifenolic a extractului se exprimă în mg echivalentului acidului galic pe gram material vegetal masa uscată [8].

Determinarea totalului flavonoidelor

Totalul flavonoidelor în extracte a fost determinat spectrofotometric prin tehnica descrisă de Quettier-Deleu [7]. La 50 μl extract s-a adăugat 450 μl de metanol și 500 μl AlCl₃ (2% soluție metanolică). S-a lăsat în repaus 15 minute după care s-a măsurat absorbanța la 430 nm. Totalul flavonoidelor în extracte s-a exprimat în mg rutozidă (1mg/ml în DMSO) pe gram material vegetal (masa uscată).

Analiza statistică

Rezultatele sunt reprezentate ca o valoare medie a patru determinări cu abaterea medie statistică ± SD, calculată în programul Excel. Corelația a fost examinată utilizând coeficientul de corelație Pearson aplicând programul GraphPad Prism (version 4.0, GraphPad Software, San Diego, California, 2003). Diferențele P<0.05 au fost considerate semnificative.

Rezultate și discuții

Acțiunea diferitor factori asupra totalului polifenolic și flavonoidelor în extractele de *C. cyanus* L. obținute prin metoda 1:

• Tehnica extracției

Materialul vegetal (*Cyani herba*) a fost divizat în două părți: o parte a fost supusă extracției consecvente cu *n*-hexan, cloroform și metanol, alta – doar cu metanol. S-au stabilit diferențe semnificative în totalul polifenolilor și flavonoidelor în extractul metanolic după *n*-hexan și cloroform și a celui metanolic (P<0.0005). Extracția metanolică directă este capabilă să extragă compuși polifenolici și flavonoide mai bine comparativ cu metanolul utilizat după extracția cu solvenți nepolari (Tabelul 1).

• Tipul solventului

S-a analizat capacitatea următorilor solvenți de a extrage polifenolii și flavonoidele: *n*-hexan, cloro-

Tabelul 1

Totalul compușilor polifenolici și flavonoidelor în extractele de *C. cyanus* L. obținute prin metoda 1

Extractul <i>Cyani herba</i> , solvent	Totalul polifenolic, exprimat în echivalentul acidului galic (mg/g masă uscată)	Totalul flavonoidelor, exprimat în echivalentul rutozidei (mg/g masă uscată)	Randamentul extracției %
N-hexan	2.21±0.10	6.54±0.90	0.6
Cloroform (după extracția hexanică)	4.90±0.60		0.6
Metanol (după extracția hexanică și metanolică)	156.63±3.96	115.96±5.80	12.26
Metanol	180.47±5.66	163.29±5.17	14.47
Soluție hidroalcoolică 60%	350.92±42.07	274.28±28.92	22.76

Tabelul 2

Totalul compușilor polifenolici și flavonoidelor în extractele de *C. cyanus L.* obținute prin metoda 1 (diferite perioade de colectare)

Produsul vegetal	Faza de vegetație	Totalul polifenolic, exprimat în echivalentul acidului galic (mg/g masă uscată)	Totalul flavonoidelor, exprimat în echivalentul rutozidei (mg/g masă uscată)	Randamentul extracției, %	
Cyani herba	Butonizare 2011	388.81±4.6278	351.06±1.20	21.79	
	Înflorire	2011	348.87±12.05	249.55±14.97	20.39
		2007	307.72±17.03	189.02±1.19	19.17
		2010	280±6.30	169.75±7.18	16.01
Cyani flores	Butonizare 2011	231.06±14.97	175.68±64.36	21.90	
	Înflorire 2011	136.97±10.80	90.78±4.24	21.90	
	Sfârșitul înfloririi	2011	159.08±10.88	60.50±2.83	19.28
	Înflorire	2006	232.77±10.58	151.28±6.13	23.97
		2007	345.44±24.02	124.15±0.69	22.02
		2008	337.74±10.39	152.03±1.20	17.29
		2009	352.92±4.57	70.47±6.24	20.72

form (după extracția cu *n*-hexan), metanol (după extracția hexanică și cloroformică), metanol și soluție hidroetanolică 60%. Selectarea corectă a solventului este foarte importantă astfel încât acesta va influența direct cantitatea și calitatea compușilor extrași. Rezultatele demonstrează că totalul compușilor fenolici și flavonoidelor este maximum în extractul hidroalcoolic 60% (350.91 mgGAE/g masă uscată și 274.28 mg rutozidă/g masă uscată, respectiv). Randamentul acestei extracții este cel mai mare – 22.76% (Tabelul 1).

• *Perioada de colectare*

În baza rezultatelor anterioare, soluția hidroalco-

olica 60% a fost selectată în calitate de solvent pentru studiul influenței perioadei de colectare asupra totalului compușilor fenolici și flavonoidelor. În calitate de material vegetal au servit părțile aeriene și inflorescențele de albăstriță colectate în anii: 2006–2011, diferite perioade de vegetație (începutul înfloririi, perioada de înflorire și sfârșitul înfloririi – inflorescențele; fazele de butonizare și înflorire în masă – părțile aeriene). Luând în considerație perioada de vegetație, totalul compușilor fenolici și flavonoidelor în extractele din părți aeriene este mai mic semnificativ ($P < 0.01$) în perioada de înflorire în masă (348.87 mgGAE/g masă uscată și 249.56 mg rutozidă/g masă uscată,

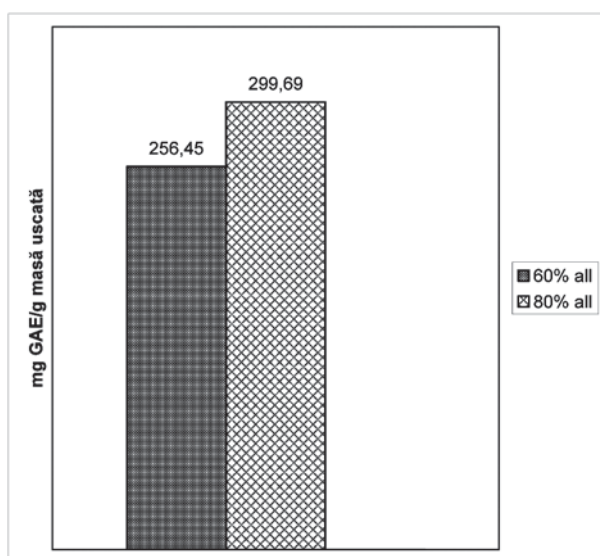


Figura 1. Totalul polifenolic exprimat în echivalentul acidului galic (mg/g masa uscată), metoda 2

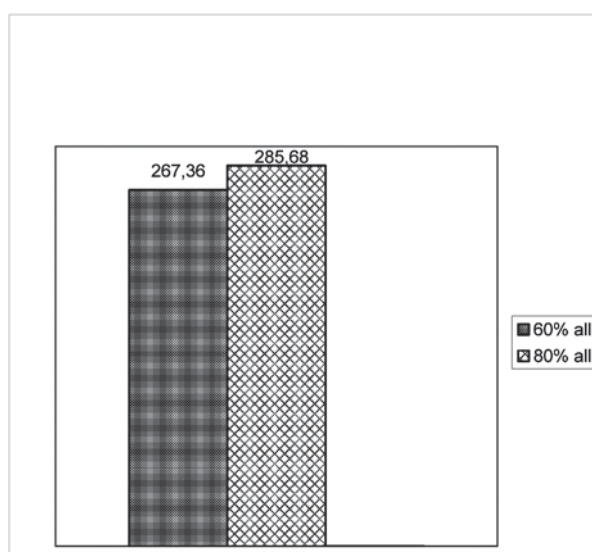


Figura 2. Totalul flavonoidelor în extracte Cyani herba exprimat în echivalentul rutozidei (mg/g masă uscată), metoda 2

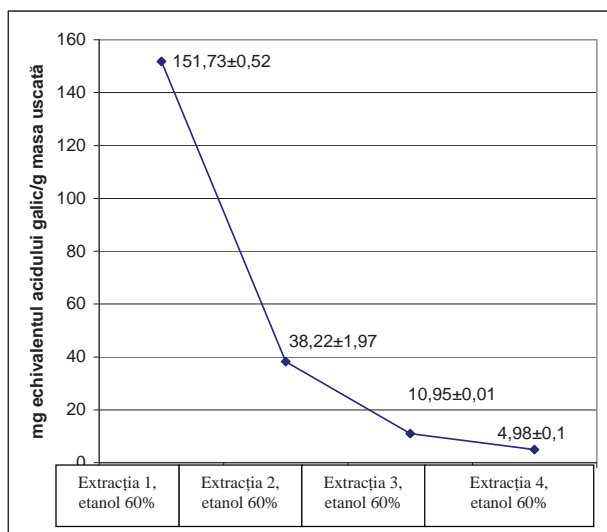


Figura 3. Efectul numărului extracțiilor asupra conținutului totalului polifenolic

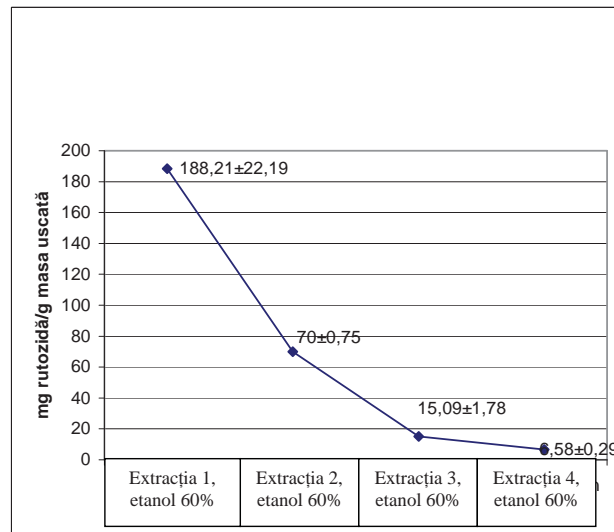


Figura 4. Efectul numărului extracțiilor asupra conținutului totalului flavonoidelor

respectiv) comparativ cu cea de butonizare (388.81 mgGAE/g masă uscată și 351.06 mg rutozidă/g masă uscată, respectiv). Au fost observate diferențe semnificative între extractele de *Cyani herba* colectate în 2011 și cele din 2007 ($P < 0.01$) și 2011 comparativ cu 2010 ($P < 0.001$). Pentru extractele *Cyani flores* conținutul total polifenolic și flavonoide diferă semnificativ. De exemplu, totalul fenolic este cel mai mare în extractul din inflorescențele colectate în 2009 (352.92 mgGAE/g masă uscată), comparativ cu totalul flavonoidelor colectate în aceeași perioadă (70.47 mg rutozidă/g masă uscată). Conținutul polifenolic și flavonoidelor este mai mare în inflorescențele colectate în 2006–2009 (337.74–352.92 mgGAE/g masă uscată) comparativ cu cele colectate în 2011 (136.97 mgGAE/g masă uscată). Valoarea conținutului poli-

fenolic și flavonoidelor este cea mai mare în faza de butonizare (231.06 mgGAE/g masă uscată și 175.68 mg rutozidă/g masă uscată, respectiv) (Tabelul 2).

- *Produsul vegetal*

Rezultatele obținute pentru extractele din *Cyani herba* și *Cyani flores* demonstrează că atât părțile aeriene cât și inflorescențele pot fi folosite ca sursă de polifenoli și flavonoide. Randamentul extracțiilor este aproximativ același (Tabelul 2).

Aciunea diferitor factori asupra totalului polifenolic și flavonoidelor în extractele de *C. cyanus L.* obținute prin metoda 2:

- *Concentrația soluției hidroalcoolice*

Efectul concentrației soluției hidroalcoolice asupra totalului compușilor polifenolici și flavonoidelor în extractele din *Cyani herba* este reprezentat

Tabelul 3

Totalul compușilor polifenolici și flavonoidelor în extractele de *C. cyanus L.* obținute prin metoda 2

Solventul	Totalul polifenolic, exprimat în echivalentul acidului galic (mg/g masă uscată)	Totalul flavonoidelor, exprimat în echivalentul rutozidei (mg/g masă uscată)	Randamentul extracției, %
Diclorometan	0.11±0.02	9.50±0.09	2.5
extracția 1, Etanol 60%	151.73±0.52	188.21±22.19	11
extracția 2, Etanol 60%	38.22±1.97	70.00±0.75	3.5
extracția 3, Etanol 60%	10.95±0.01	15.09±1.78	1
extracția 4, Etanol 60%	4.98±0.1	6.58±0.29	0.5
extracția 1, Etanol 80%	92.62±0.05	148.49±7.18	7.5
extracțiile 2, 3, 4, Etanol 80%	87.73±2.11	145.84±7.32	7.0
Etanol 60% (extractele combinate)	256.45	267.36±0.64	16
Etanol 80% (extractele combinate)	299.69	285.68±1.43	14.5

în figurile 1 și 2. Soluția hidroalcoolică 80% manifestă capacitate de extracție semnificativ mai mare ($P < 0.0008$ pentru totalul fenolic și $P < 0.0001$ – totalul flavonoidelor), valoarea totalului compușilor fenolici fiind 299.69 mg GAE/g masă uscată și totalul flavonoidelor – 285.68 mg rutozidă/g masă uscată, comparativ cu soluția hidroetanolică 60% (256.45 mg GAE/g masă uscată – totalul fenolilor și 267.36 mg rutozidă/g masă uscată – totalul flavonoidelor).

• Numărul extracțiilor

Numărul extracțiilor este un alt factor capabil să influențeze procesul de extracție. Conținutul totalului polifenolilor descrește de la 151.73 (prima extracție) până la 4.98 (a patra extracție) mg GAE/g DW. Pentru totalul flavonoidelor observăm aceeași succesiune - de la 188.21 (prima extracție) până la 6.58 (a patra extracție) mg rutozidă/g masă uscată, vezi figurele 3 și 4. Rezultatele efectului numărului de extracție asupra randamentului sunt reprezentate în tabelul 3. Randamentul extracției descrește semnificativ de la 11 la 0.5%.

Concluzii

Au fost obținute extracte polifenolice din părți aeriene și inflorescențe de albăstriță. S-a studiat acțiunea diferitor factori asupra totalului polifenolic și flavonoidic în extractele de *Cyani herba* și *Cyani flores*. S-a demonstrat că maximum de compuși fenolici și flavonoide se extrag cu alcool etilic de 60% sub acțiunea ultrasunetului 3 ore (3×10 ml/g). În calitate de produs vegetal se pot utiliza atât părțile aeriene (colectate în perioada de butonizare și înflorire) cât și inflorescențele de *Centaurea cyanus* L.

Bibliografie

1. Dae-Ok Kim and Chang Y. Lee. *Extraction and isolation of polyphenolics*. In: Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2002; Unit II.2.1-II.2.12. John Wiley & Sons, Inc.
2. Garbacki Nancy, Gloaguen V., Damas J., Bodart P., Tits M., Angenot L. *Anti-inflammatory and immunological effects of Centaurea cyanus flower-heads*. Journal of Ethnopharmacology, 1999; 68(1-3): 235–241.
3. Karamenderes C., Konyalioglu S., Khan S. and Khan I. A. *Total phenolic contents, free radical scavenging activities and inhibitory effects on the activation of NF-kappa B of eight Centaurea L. species*. Phytotherapy research 2007; 21: 488–491.
4. Litvinenko V. I., Bubencikova V. N. *Phytochemical study of Centaurea cyanus L.* Chemistry of Natural Compounds, 2007; 24(6): 672–674.
5. Muravieva D. A., Bubencikova V. N. *Phenolcarboxylic acids of the flowers of Centaurea cyanus L.* Chemistry of Natural Compounds, 2007; 22(1): 102.
6. Pîrvu L., Căprean D., Schiopu D., Colceru Mihul S. *Vegetal extracts with gastroprotective activity. Part I. Extracts obtained from Centaurea cyanus L. raw material.*

Romanian Biotechnological Letters, 2012; 17 (2): 7169–7176.

7. Quettier-Deleu, C. et al. *Phenolic compounds and antioxidants activities of buckwheat hulls and flour*. Journal of Ethnopharmacology, 2000; 72: 35–42.

8. Singleton V. L., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R.M. *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent*. Methods in enzymology, 1999; vol. 299: 152–177. Academic Press, San Diego, California.

Rezumat

Obiectivul prezentei lucrări a fost de a obține extracte polifenolice din *Centaurea cyanus* L. În vederea optimizării condițiilor extracției s-au analizat parametrii care pot influența procesul: tipul și concentrația solventului (etanol 60 și 80%), produsul vegetal, perioada de colectare a produsului vegetal, numărul extracțiilor. S-a demonstrat că totalul compușilor fenolici și flavonoidelor este maximum în extractul hidroalcoolic 60% (350.91 mgGAE/g și 274.28 mg rutozidă/g masă uscată, respectiv), obținut din părți aeriene colectate la începutul înfloririi.

Cuvinte-cheie: Compuși fenolici, flavonoide, *Centaurea cyanus* L.

Summary

The work was carried out to optimize the extraction conditions for the best recovery of phenols and flavonoids from *Centaurea cyanus* L. The extracts were obtained through different extraction techniques. Many factors have been established to influence the extraction efficiency, such as solvent type, solvent concentration (ethanol 60 and 80%), harvesting stage, vegetal product, number of extractions. The results indicated that the total content of phenols and flavonoids was maxima in hydroalcoholic 60% extraction (350.91 mg GAE/g DW and 274.28 mg rutin/g DW, respectively), using aerial parts of the plant collected in the budding stage.

Keywords: Phenols, flavonoids, *Centaurea cyanus* L.

Резюме

Цель данной работы является разработка способа получения полифенольного экстракта из *Centaurea cyanus* L. Было исследовано влияние различных факторов на эффективность экстракции: тип экстрагента и его концентрация (60 и 80% этиловый спирт), период сбора, лекарственное сырьё, кратность экстрагирования. Оптимальными параметрами при выделении фенольного комплекса являются: экстрагент – 60% этиловый спирт, используя траву василька синего в начале цветения.

Ключевые слова: Фенольные соединения, флавоноиды, *Centaurea cyanus* L.