

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ  
DEPARTAMENTUL DE CARDIOLOGIE**

**ARDELEAN FLORINA**



**TEZĂ DE DOCTORAT**  
**CONTRIBUȚII LA STUDIUL EXTRACTELOR VEGETALE  
POLIFENOLICE ȘI AL SUPLIMENTELOR ALIMENTARE ÎN  
SINDROMUL METABOLIC**

Conducător Științific  
**PROF. UNIV. DR. DRĂGAN SIMONA RUXANDA**

**Timișoara  
2017**

# CUPRINS

Lista lucrărilor publicate .....	VI
Lista abrevierilor.....	VII
Indexul Figurilor .....	VIII
Indexul Tabelelor .....	XI
Mulțumiri .....	XII
INTRODUCERE.....	XIII

## PARTEA GENERALĂ

1. Sindromul metabolic .....	1
1.1. Definițiile sindromului metabolic .....	1
1.2. Incidența în populație .....	3
1.3. Abordarea terapeutică a sindromului metabolic .....	5
1.3.1. Modificarea stilului de viață .....	6
1.3.2. Farmacoterapia .....	7
1.3.3. Abordarea nutraceutică a sindromului metabolic .....	10
1.3.3.1 Importanța acțiunii antioxidante în abordarea nutraceutică a sindromului metabolic .....	12
2. Compuși vegetali polifenolici în managementul sindromului metabolic .....	14
2.1. Resveratrolul .....	16
2.2. Flavonoidele .....	21
2.3. Acizii polifenolcarboxilici .....	25
3. <i>Polygonum cuspidatum</i> (troscotul japonez) ca sursă de polifenoli .....	27
3.1. Componente bioactive .....	28
3.2. Utilizări terapeutice tradiționale și moderne .....	29

## PARTEA SPECIALĂ

1. Evaluarea activității antioxidante și a conținutului de resveratrol, flavonoide și compuși polifenol-carboxilici în suplimente alimentare .....	33
1.1. Scopul studiului și obiective .....	33
1.2. Materiale și metode .....	34
1.2.1. Suplimente alimentare și reactivi .....	34
1.2.2. Determinarea conținutului de resveratrol în suplimentele alimentare .....	34
1.2.3. Identificarea și cuantificarea flavonoidelor și acizilor fenolici în suplimentele alimentare .....	36
1.2.4. Evaluarea activității antioxidante a suplimentelor alimentare prin metoda TEAC și spectroscopie EPR .....	39

1.3. Rezultate .....	40
1.3.1. Analiza comparativă a conținutului de resveratrol în suplimentele alimentare .....	40
1.3.2. Analiza comparativă a conținutului de polifenoli prezenți în suplimentele alimentare .....	45
1.3.3. Activitatea antioxidantă .....	49
1.4. Discuții .....	51
2. Evaluarea suplimentelor alimentare cu conținut de resveratrol la pacienți cu sindrom metabolic .....	55
2.1. Obiective .....	55
2.2. Pacienți și metode .....	55
2.3. Rezultatele studiului clinic 1 .....	57
2.3.1. Caracteristicile la includerea în studiu .....	57
2.3.2. Efecte asupra profilului lipidic .....	59
2.3.3. Efecte asupra tensiunii arteriale .....	62
2.3.4. Efecte asupra glicemiei .....	63
2.3.5. Efecte asupra parametrilor antropometrici .....	64
2.4. Rezultatele studiului clinic 2 .....	65
2.4.1. Caracteristicile la includerea în studiu .....	65
2.4.2. Efecte asupra profilului lipidic .....	67
2.4.3. Efecte asupra tensiunii arteriale .....	69
2.4.4. Efecte asupra glicemiei .....	70
2.4.5. Efecte asupra parametrilor antropometrici .....	71
2.4.6. Efecte asupra ariei grăsimii viscerale .....	72
2.5 Discuții .....	72
3. Contribuții la studiul potențialului de utilizare terapeutică a unei varietăți invazive de <i>Polygonum cuspidatum</i> .....	77
3.1. Scopul studiului și obiective .....	77
3.2. Materiale și metode .....	77
3.2.1. Obținerea extractelor vegetale .....	77
3.2.2. Reactivi .....	78
3.2.3. Evaluarea activității antioxidante a extractelor obținute din diferite organe vegetale .....	79
3.2.4. Determinarea polifenolilor totali prin metoda Folin-Ciocalteu .....	79
3.2.5. Analiza fizico-chimică a extractelor prin spectroscopie FT-IR și TG/DSC .....	80
3.2.5.1. Analiza FT-IR .....	80
3.2.5.2. Analiza termică prin TG/DSC .....	80
3.2.6. Identificarea resveratrolului în extractele vegetale prin CSS .....	80
3.2.7. Determinarea conținutului de resveratrol în extractele vegetale .....	81

3.3. Rezultate .....	81
3.3.1. Activitatea antioxidantă .....	81
3.3.2. Conținutul de fenoli totali .....	86
3.3.3. Caracteristici spectroscopice și particularități TG/DSC .....	87
3.3.3.1. Analiza FT-IR .....	87
3.3.3.2. Analize termice prin TG/DSC .....	91
3.3.4. Identificarea resveratrolului prin CSS .....	94
3.3.5. Conținutul de resveratrol în extractele vegetale .....	95
3.4. Discuții .....	95
<b>Concluzii</b> .....	102
<b>Bibliografie</b> .....	105
<b>ANEXE</b> .....	I

**CUVINTE CHEIE:** resveratrol, polifenoli, sindrom metabolic, suplimente alimentare, *Polygonum cuspidatum*

## CONTEXTUL CERCETĂRII

Stilul de viață caracterizat prin sedentarism, alimentația bogată în grăsimi saturate și zaharuri se concretizează printr-o asociere de factori de risc pentru boala cardiovasculară: sindromul metabolic. Dislipidemia, obezitatea, rezistența la insulină și hipertensiunea arterială sunt componentele principale ale acestui sindrom. În cazul în care modificările stilului de viață nu sunt suficiente pentru ameliorarea stării de sănătate este necesar tratamentul medicamentos. Terapia include o asociere de clase de medicamente, unele determinând efecte adverse ce impun reducerea dozelor sau întreruperea tratamentului. Un exemplu mai frecvent în acest sens este intoleranța la statine, medicamente hipolipemiante utilizate pe scară largă în contextul sindromului metabolic.

Abordarea farmacologică nu este întotdeauna suficientă, la unii pacienți riscul cardiovascular rămânând crescut. Din acest motiv, o atenție tot mai mare este acordată nutraceuticelor și extractelor din plante care au dovedit în studii efecte favorabile în reducerea factorilor de risc asociați sindromului metabolic. Dintre fitocompuși, resveratrolul a devenit cunoscut ca urmare a prezenței sale în vinul roșu și a activității cardioprotectoare. Acțiunile antioxidantă, antiinflamatoare, hipolipemiantă sau anticanceroasă evidențiate în studii au determinat includerea sa în numeroase suplimente alimentare, singur sau în asociere cu extracte din plante bogate în polifenoli.

Diverse extracte vegetale sunt utilizate de către persoanele orientate către un stil de viață sănătos, dar și de către pacienți cu afecțiuni cronice care doresc să își amelioreze starea de sănătate. Ei asociază frecvent suplimentele alimentare terapiei medicamentoase fără o recomandare specializată. Multitudinea de suplimente alimentare existente pe piața farmaceutică și accesul ușor al pacienților la ele reprezintă factori ce încurajează creșterea consumului. Asigurarea calității acestor preparate este deosebit de importantă, pentru a se obține beneficiile pentru sănătate.

Deși există numeroase studii experimentale *in vitro* și *in vivo* pe animale, numărul studiilor clinice care urmăresc eficacitatea și relevanța acestor produse în sindromul metabolic este redus. Prezența în suplimentele alimentare a ingredientelor active în cantitatea declarată de producător este importantă pentru asigurarea calității acestora. Conform prevederilor, suplimentele nu trebuie să corespundă aceluiași exigențe de calitate ca și medicamentele deși se prezintă frecvent în aceleași forme farmaceutice.

## OBIECTIVELE CERCETĂRII

Teza de doctorat a inclus trei cercetări originale având ca temă centrală aspecte aplicative ale resveratrolului în sindromul metabolic. Ea a urmărit:

- i) evaluarea suplimentelor alimentare cu resveratrol de pe piața românească din punct de vedere al compoziției și activității antioxidante;
- ii) beneficiul adăugării a două din suplimentele cu resveratrol analizate la medicația pacienților cu sindrom metabolic în cadrul a două studii clinice;
- iii) studiul unor extracte cu resveratrol din flora autohtonă (*Polygonum cuspidatum*) ca sursă ușor regenerabilă și larg disponibilă de resveratrol și extracte polifenolice pentru

obținerea de suplimente alimentare standardizate ce pot aduce beneficii suplimentare în sindromul metabolic.

## **PARTEA SPECIALĂ a lucrării este structurată pe trei capitole:**

### **1. Evaluarea activității antioxidante și a conținutului de resveratrol, flavonoide și compuși polifenol-carboxilici în suplimente alimentare**

Scopul acestui studiu a constat în identificarea și cuantificarea resveratrolului și a altor compuși polifenolici în nouă suplimente alimentare disponibile pe piața farmaceutică din România, alături de evaluarea capacității lor antioxidante. Compușii polifenolici analizați au fost din clasa flavonoidelor (hiperozida, quercitrina, isoquercitrina, quercetol, rutina, miricetol, kaempferol, luteolina, fisetina, apigenina, patuletina) și a acizilor fenolici (acid clorogenic, acid cafeic, acid p-cumaric, acid ferulic, acid caftaric, acid sinapic, acid gentisic).

Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) cuplată cu spectrometria de masă (MS) a fost utilizată în studiul compușilor polifenolici, iar capacitatea antioxidantă a fost determinată prin metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) și spectroscopie EPR (Electron Paramagnetic Resonance).

Procentul de resveratrol regăsit comparativ cu valorile declarate a variat între 22,8% și 104,7%. Doar două din cele 9 suplimente analizate au prezentat un conținut de resveratrol cuprins între 95 și 105% din cantitatea declarată de producător. Șase suplimente au prezentat un conținut de resveratrol mai mare de 80%. În compoziția suplimentelor alimentare au fost identificați de asemenea 13 din cei 18 compuși polifenolici investigați, alături de resveratrol. Quercetolul a fost identificat și cuantificat în 6 produse, kaempferolul în 5, acidul p-cumaric și acidul ferulic în 4, hiperozida, isoquercitrina, rutina, miricetolul și quercitrina în 2, iar luteolina într-un singur supliment alimentar. Acidul clorogenic, acidul caftaric și acidul gentisic au fost determinați calitativ în 2, 1 și respectiv 2 produse. Toate suplimentele alimentare analizate au prezentat activitate antioxidantă. Rezultatele obținute prin cele două metode au fost similare. Cele mai ridicate valori ale activității antioxidante au fost observate pentru suplimentele în care au fost identificați 9 polifenoli din cei analizați, alături de resveratrol.

### **2. Evaluarea suplimentelor alimentare cu conținut de resveratrol la pacienți cu sindrom metabolic**

Obiectivul acestui studiu a constat în evaluarea efectelor a două suplimente alimentare cu resveratrol la pacienți cu sindrom metabolic, pentru a identifica beneficiile asocierii unor astfel de produse la tratamentul medicamentos al acestor pacienți.

Studiul clinic 1 a inclus 30 de pacienți cu sindrom metabolic, fiind un studiu randomizat, simplu orb, cu grupuri paralele, desfășurat pe o durată de 3 luni. Pacienții incluși în acest studiu au fost randomizați în 2 grupuri. Primul grup (Grup 1) a fost alcătuit din 15 pacienți cărora li s-a administrat un supliment alimentar cu 15 mg resveratrol, iar cel de-al doilea (Grup 2) a fost format din 15 pacienți care au primit placebo.

Studiul clinic 2 a inclus 30 de pacienți cu sindrom metabolic, fiind de asemenea un studiu simplu orb, randomizat, cu grupuri paralele și cu o durată de 3 luni. Pacienții au fost randomizați în 2 grupuri. Primul grup (Grup A) a fost alcătuit din 15 pacienți cărora li s-a

administrat un supliment alimentar conținând 250 mg resveratrol. Al doilea grup (Grup B) a inclus 15 pacienți care au primit placebo.

Diagnosticarea sindromului metabolic s-a realizat pe baza criteriilor NCEP-ATP III. Pe parcursul studiului pacienții au utilizat medicația prescrisă anterior. Au fost urmărite efectele asupra parametrilor relevanți pentru sindromul metabolic (parametrii lipidici (colesterol total, trigliceride, LDL, HDL), tensiunea arterială, glicemie, greutate).

Asocierea suplimentului alimentar cu un conținut redus de resveratrol (15 mg) la tratamentul medicamentos al pacienților cu sindrom metabolic nu a prezentat efecte superioare placebo, cu excepția creșterii HDL apropiată de pragul semnificației statistice.

Asocierea suplimentului cu un conținut de 250 mg de resveratrol la medicația pacienților a determinat efecte modest superioare placebo asupra parametrilor sindromului metabolic (parametrii lipidici, tensiune arterială, glicemie).

### **3. Contribuții la studiul potențialului de utilizare terapeutică a unei varietăți invazive de *Polygonum cuspidatum***

Troscotul japonez (*Polygonum cuspidatum* Sieb. & Zucc., sinonim *Reynoutria japonica* Houtt.) este cunoscut pentru conținutul de resveratrol. Exemplele invazive din România nu au fost investigate suficient până în prezent privind conținutul de resveratrol și bioactivitate.

Obiectivele studiului au fost determinarea și compararea conținutului de polifenoli totali al extractelor metanolice obținute din diferite organe vegetale (rizomi, tulpini, frunze, flori), evaluarea comparativă a activității antioxidante prin metoda DPPH, caracterizarea și compararea acestor extracte prin FT-IR (spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier) și TG/DSC (Termogravimetrie – Calorimetrie cu scanare diferențială) precum și identificarea și cuantificarea resveratrolului în extracte prin CSS (Cromatografie în Strat Subțire) și LC-MS.

Cea mai ridicată activitate antioxidantă a fost evidențiată pentru extractele obținute din rizomi subțiri și flori (92%) la cea mai mare concentrație evaluată (1mg/mL), dar valori foarte apropiate au fost observate și pentru extractele din rizomi groși (91%), frunze (90%) și tulpini (88%). Valorile obținute pentru extractele din flori și cele din rizomi subțiri nu au fost foarte diferite de cele obținute pentru acidul ascorbic, un antioxidant recunoscut (92% versus 95%).

În extractele studiate conținutul de fenoli totali a variat în funcție de organul vegetal utilizat pentru obținerea lor. Cea mai mare cantitate de fenoli totali a fost identificată în extractul din rizomi groși (156,61 mg GAE/ g extract), iar cea mai scăzută în extractul obținut din tulpini (59,56 mg GAE/g extract).

Analiza FT-IR a extractelor obținute din rizomii, tulpinile, frunzele și florile speciei *Polygonum cuspidatum* a evidențiat caracteristici similare ale spectrelor obținute pentru cele cinci extracte. Au putut fi identificate mai multe benzi caracteristice unor elemente structurale ale componenților extractelor analizate. Analiza termică a extractelor din diferite organe vegetale de troscot japonez a fost realizată pentru caracterizarea stabilității și comportamentului termic al acestora.

Resveratrolul a fost identificat în toate cele cinci extracte analizate, cele mai mari cantități fiind observate pentru părțile subterane (1771,56 μg/g produs vegetal în rizomii subțiri, respectiv 2990,77 μg/g produs vegetal în rizomii groși). Organele supraterane au prezentat un conținut mai redus comparativ cu cele subterane.

## CONCLUZII

1. Analiza conținutului de resveratrol, flavonoide, acizi fenolici și evaluarea activității antioxidante a nouă suplimente alimentare cu resveratrol de pe piața farmaceutică din România a arătat:

- Conținutul de resveratrol în cele nouă suplimentele analizate a variat între 22,8 și 104,7 % din cantitatea declarată de producător. Doar două din produsele analizate s-au încadrat în abaterea de  $\pm 5\%$  față de cantitatea declarată.
- În șase suplimente alimentare analizate au fost cuantificați și alți compuși polifenolici alături de resveratrol. Toate suplimentele alimentare analizate au prezentat activitate antioxidantă, cu variații în funcție de compoziție.

2. Evaluarea beneficiilor suplimentelor alimentare cu resveratrol versus placebo la 60 pacienți cu sindrom metabolic aflați sub tratament specific (antihipertensiv / hipolipemiant / hipoglicemiant) în cadrul a două studii clinice desfășurate câte 3 luni, a evidențiat următoarele:

- Asocierea suplimentului alimentar cu 15 mg resveratrol la medicația pacienților cu sindrom metabolic nu a prezentat efecte superioare placebo, cu excepția creșterii HDL apropiată de pragul semnificației statistice.
- Asocierea suplimentului alimentar cu un conținut de 250 mg resveratrol la tratamentul medicamentos al pacienților cu sindrom metabolic a determinat efecte modest superioare față de placebo asupra parametrilor sindromului metabolic.
- În ciuda dificultății interpretării din punct de vedere statistic a rezultatelor la pacienții polimedicați cu sindrom metabolic, datorită multiplelor interferențe, această categorie este frecventă în practica clinică și trebuie să poată beneficia de o îmbunătățire a tratamentului farmacologic standard.

3. Studiul privind planta autohtonă *Polygonum cuspidatum* a evidențiat:

- Extractele din rizomii, tulpinile, florile și frunzele de *Polygonum cuspidatum* au prezentat o activitate antioxidantă crescută, cea mai ridicată fiind observată pentru extractele din rizomi subțiri și din flori (concentrație de 1 mg/mL), valori apropiate fiind observate însă și pentru rizomii groși, frunze și tulpini la aceeași concentrație.
- Resveratrolul a fost identificat și cuantificat în toate extractele, cel mai ridicat conținut fiind în rizomi.

Rezultatele obținute în prezenta lucrare au permis crearea unei imagini privind compoziția și activitatea suplimentelor alimentare cu resveratrol existente pe piață și au putut propune un material vegetal ușor regenerabil și larg disponibil ca sursă autohtonă de resveratrol și extracte polifenolice.

În perspectivă, evaluarea unor extracte și fracțiuni din diferite organe de *Polygonum cuspidatum* din România cu privire la acțiuni relevante pentru sindromul metabolic (hipolipemiant, antidiabetic, cardioprotector) ar putea valorifica experimentele din prezenta teză. Formularea unor suplimente alimentare cu extracte standardizate din această plantă reprezintă un obiectiv pentru viitoare cercetări.