

PLANTELE MEDICINALE – ACTUALITĂȚI ÎN CERCETARE ȘI UTILIZAREA TERAPEUTICĂ

ARTICOLE IN EXTENSO

CZU: 615.322:582.734.4

PROFILUL ANTIOXIDANT ȘI ANTIMICROBIAN AL EXTRACTULUI POLIFENOLIC DIN PĂRȚI AERIENE DE *AGRIMONIA EUPATORIA* L.

ANTIOXIDANT AND ANTIMIRBIOLOGICAL PROFILE OF POLYPHENOLIC EXTRACT FROM AERIAL PARTS OF *AGRIMONIA EUPATORIA* L.

Maria COJOCARU-TOMA

Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

Autor corespondent: maria.cojocaru@usmf.md

Rezumat. Turița (*Agrimonia eupatoria* L.) are o istorie lungă de utilizare și este considerată un bun regenerant. Prin metoda Cromatografiei Lichide de Înaltă Performanță (CLÎP) s-au analizat compușii polifenolici în extractul hidroetanolic de *Agrimoniae herba*: taninurile, cu conținut înalt de catechină și epicatechină; flavonoidele (rutozidă, quercetol, kaempferol, apigenină și luteolină) și acizii hidroxicinamici (clorogenic, cafeic, elagic și cioric). Activitatea antioxidantă a extractului de *Agrimoniae herba* realizată prin metodele DPPH, ABTS●+ și capacitatea de chelare a fierului, cât și activitatea antibacteriană, în concentrațiile de: 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078 mg/ml, prin metoda diluției succesive, pe tulpini de referință Gram-pozitive și Gram-negative, încurajează efectuarea studiilor ulterioare pentru extractul din turiță.

Summary. Agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.), has a long history of use and it is considered a good healer. The polyphenolic compounds in the hydroethanolic extract of *Agrimoniae herba* were analyzed by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method: tannins, with high content of catechin and epicatechin; flavonoids (rutin, quercetol, kaempferol, apigenin and luteolin) and hydroxycinnamic acids (chlorogenic, caffeic, ellagic and cychoric). The antioxidant activity of *Agrimoniae herba* extract, accomplished by DPPH, ABTS●+ and iron chelating capacity, as well as antibacterial activity in concentrations of: 5; 2.5; 1.25; 0.625; 0.625; 0.625; 0.312; 0.156; 0.078 mg/ml - successive dilutions method, on Gram-positive and Gram-negative reference strains, encourages further studies on the extract of Agrimony.

INTRODUCERE

Piața farmaceutică prezintă o multitudine de produse fitoterapeutice bogate în polifenoli cu un spectru larg farmacoterapeutic și un profil de siguranță ridicat [1]. Totodată, crește interesul față de potențialele beneficii pentru sănătate ale plantelor și produselor extractive, ale căror efecte farmacologice se explică prin prezența metaboliților secundari [2], în mare parte a compușilor polifenolici, care sunt tot mai studiați pentru spectrul lor larg farmacoterapeutic. Compușii fenolici (flavonoidele, acizii fenolici și taninurile) au trezit un interes sporit prin conținutul lor înalt în produse vegetale, cât și reducerea riscului apariției unor maladii, grație proprietăților antioxidante

și antibacteriene [3, 4]. Antioxidanții sunt valoroși prin proprietatea de a elimina radicalii liberi și alte grupe de oxigen și azot, ce contribuie la dezvoltarea bolilor cronice, iar plantele oferă organismului o sursă suplimentară de compuși activi cu proprietăți antioxidante și antibacteriene [5].

Una din speciile din colecția Centrului Științifico-Practic în Domeniul Plantelor Medicinale (CȘPDPM) a Universității de Stat de Medicină și Farmacie (USMF) „Nicolae Testemițanu”, cu un conținut înalt de compuși polifenolici este turița (*Agrimonia eupatoria* L., familia Rosaceae), utilizată pe larg în diverse afecțiuni: gastrointestinale, pulmonare, diabet, boli de piele [6]. Părțile aeriene de turiță (*Agrimoniae herba*) se utilizează sub formă de infuzie, decoct, tinctură, extracte hidroalcoolice, datorită proprietăților lor antibacteriene, antioxidante, antiinflamatorii și astringente [7, 8]. Produsul vegetal *Agrimoniae herba* are o bogată compoziție chimică, în mare parte constituită din compuși fenolici; flavonoide: quercetol, rutozidă, quercetrină, luteolină, apigenină; taninuri: catechină, procianidină și elagotaninuri, în principal agrimoniină; acizi hidroxicinamici: cafeic, galic, clorogenic; terpenoide, cumarine, saponine [9], polifenolii, fiind însoțiți de carbohidrați: glucoză, fructoză, galactoză, arabinoză; acizi organici: citric, malic, oxalic, tartric.

Totalul de polifenoli, determinat în *Agrimoniae herba* după Folin-Ciocalteu, constituie 124.5 ± 0.032 mg GAE/% [10] și cu un conținut de flavonoide de 37.2 ± 0.024 mg RU/%. [11]. În Laboratorul Evaluare preclinică și clinică a medicamentelor a CȘDM în extractele standardizate după totalul de polifenoli și flavonoide, s-a determinat toxicitatea acută pe 2 specii de animale: șoareci și șobolani, în doze de 200, 1000, 2000, 4000, 6000 mg/kg, prin administrare intragastrală și intraperitoneală, ce denotă că extractul se clasează în clasa 5 și este practic inofensiv [12]. Viabilitatea și citotoxicitatea *in vitro* a extractului obținut din *Agrimoniae herba* a fost evaluată în cadrul Laboratorului de inginerie tisulară și culturi a USMF „Nicolae Testemițanu”, metoda fiind bazată pe capacitatea succinat dehidrogenazei din mitocondriile hepatocitelor izolate de la animale de laborator de a reduce sărurile de tetrazolium solubile în formazan insolubil, cu formarea culorii roșie violet. Prin tehnica MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid, s-a demonstrat viabilitate celulară a extractului de turiță în doze de 100, 200, 600 mg/kg, doza de 1000 mg/kg manifestând citotoxicitate [13].

SCOPUL LUCRĂRII

Analiza fitochimică a extractului etanolic din părți aeriene de *Agrimonia eupatoria* prin CLÎP cu detecție UV-VIS în scopul cuantificării principalilor compuși fenolici (flavonoide, taninuri, acizi fenolici) cu evaluarea ulterioară a activităților antioxidante și antibacteriene.

MATERIAL ȘI METODE

Recoltarea produsului vegetal și obținerea extractului. Părțile aeriene de turiță *Agrimonia eupatoria* L., au fost recolectate din colecția CȘPDPM în perioada de înflorire, cu respectarea recomandărilor monografiei farmaceutice [14]. Produsele vegetale uscate sub formă de pulbere au fost trecute printr-o sită de 0,5 mm. Extracția s-a realizat cu agitator magnetic, până la epuizarea produselor vegetale pulverizate, folosind un amestec de alcool etilic (60%, g/g): apă timp de o jumătate de oră la fiecare etapă de extracție, în 3 reprize, amestecurile de alcool: apă, fiind considerate eficiente pentru extragerea polifenolilor cu greutate moleculară mică [15]. Soluția extractivă a fost filtrată prin pâlnia Buchner, după un repaos la rece la temperatura 2-8°C de 24 ore, iar extractele uscate au fost concentrate folosind un evaporator rotativ-Laborota 4011 [12].

Analiza CLÎP a fost efectuată la cromatograful Shimadzu LC-20AD cu UV-detector SPD-20A, fază staționară- Zorbax Eclipse Plus C18, realizat în 2 faze mobile: amestecul de solvenți metanol: apă (40:60) cu eluare gradientă și acid ortofosforic 0,5%: acetonitril

(80:20) cu modul de eluare izocratic și detecție la lungimile de undă 280, 325 și 360 nm, deoarece majoritatea compușilor fenolici izolați din plante sunt ușor ionizați în condiții bazice și dizolvați în solvenți polari [16, 17, 18]. Cuantificarea metodei CLIP a fost efectuată utilizând timpul de retenție a extractului analizat în raport cu standardele de referință [19, 20, 21], pentru flavonoide (rutozidă, kaempferol, apigenină, luteolină, quercetol), acizi hidroxicinamici (clorogenic, cafeic, elagic); taninuri (catechina și epicatechina), standarde de la producătorul Sigma Aldrich.

Activitatea antioxidantă a extractului obținut din părți aeriene de *Agrimonia eupatoria* s-a realizat prin metode complementare: testul DPPH (2,2, difenil-picril-hidrazil, de decolorare a radicalului stabil), colorat puternic în roșu-purpuriu, cu absorbția la 515 nm și determinarea capacității antiradicalice prin utilizarea radicalului cation ABTS^{•+} a extractului [22].

Activitatea antimicrobiană a extractului de *Agrimoniae herba* (10 mg), dizolvat în 1 ml soluție izotonică de clorură de sodiu, s-a realizat în concentrațiile de: 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078 mg/ml, prin metoda diluției succesive [23], cu determinarea concentrației minime inhibitorie (CMI) și concentrației minime bactericide (CMB), pe tulpini de referință: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Bacillus cereus* ATCC 11778; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 și *Candida albicans* ATCC 10231.

REZULTATE

Pentru succesul unei investigații analitice a compușilor chimici în produsele vegetale sunt importanți mai mulți factori, de la recoltare, obținerea produselor extractive, până la identificarea metodei optime de analiză fitochimică, unde un rol aparte revine metodelor performante, inclusiv analizei prin cromatografie lichidă de înaltă performanță [24]. Rezultatele analizei CLIP indică faptul că sistemul de solvenți care a realizat separarea optimă a compușilor fenolici a fost amestecul de acid ortofosforic 0,5%:acetonitril (80:20) la o lungime de undă de 280 nm pentru taninuri, 325 nm pentru acizi fenolici și 360 nm pentru flavonoide.

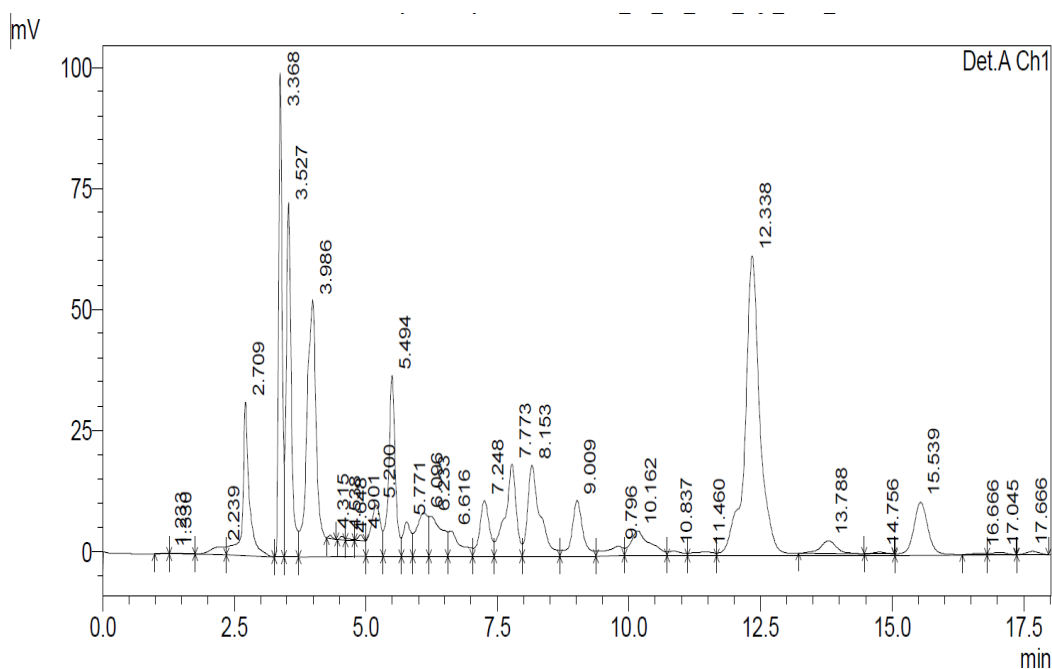


Figura 1. Detectarea prin cromatografie lichidă de înaltă performanță-UV-VIS în extractul etanolic din părți aeriene de *Agrimonia eupatoria*

Dintre flavonoide (*figura 1, tabelul 1*), au fost identificate în extractul etanolic de *Agrimonia eupatoria*: rutozidă, quercetol, apigenină, luteolină, faza mobilă metanol și extracte de apă (80:20). Conținutul de flavonoide arată o cantitate mai mare de rutozidă, de 1,705%, urmat de quercetol cu 0,199%, luteolină, kaempferol și un conținut mai mic de apigenină (0,078%).

Dintre acizii hidroxicinamici, au fost identificați: clorogenic, cafeic, elagic și cicoric, cu ajutorul fazei mobile: 0,5% acid ortofosforic: acetonitril (80:20) cu modul de eluție izocratic, cu un conținut mai înalt de acid cafeic (0,635%), urmată de acid cicoric (0,236%), acid clorogenic (0,236%), până la conținutul cel mai mic de acid elagic (0,101%). Din taninuri: catechina și epicatechina au fost identificate, utilizând faza mobilă metanol și apă (80:20), la lungimea de undă analizată de 280 nm. Observăm că extractul etanolic din părți aeriene de *A. eupatoria* este mai bogat în taninuri: (+)- catechină (3,683%), urmat de (-)- epicatechină (2,593%). Timpul de retenție (minute) și concentrația (%) a compușilor fenolici în extracte etanolice obținute din părți aeriene de *A. eupatoria* se prezintă în tabelul 1.

Tabelul 1. Timpul de retenție și concentrația compușilor fenolici în extractele etanolice din părți aeriene de *Agrimonia eupatoria*

Nr.	Flavonoide	Rt (minute)	C(%)
1.	Rutozidă	6,545	1,705
2.	Kaempferol	11,22	0,162
3.	Apigenină	11,54	0,078
4.	Luteolină	10,36	0,184
5.	Quercetol	9,98	0,199
	Acizi fenolici	Rt (minute)	C(%)
1.	Acid clorogenic	3,89	0,124
2.	Acid elagic	2,72	0,101
3.	Acid cafeic	5,38	0,635
4.	Acid cicoric	12,18	0,236
	Taninuri	Rt (minute)	C(%)
1.	(+)- catechină	4,30	3,683
2.	(-)- epicatechină	4,91	2,593

Notă: Rt – timpi de retenție (minute); C – concentrația (%).

Activitatea antioxidantă s-a realizat prin metode complementare. Metoda DPPH denotă activitate antioxidantă pronunțată, pentru extractul obținut din *A. eupatoria* ($IC_{50} = 45,55 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$), față de Trolox ($y = 3,1251x + 12,538$; $R^2 = 0,9969$).

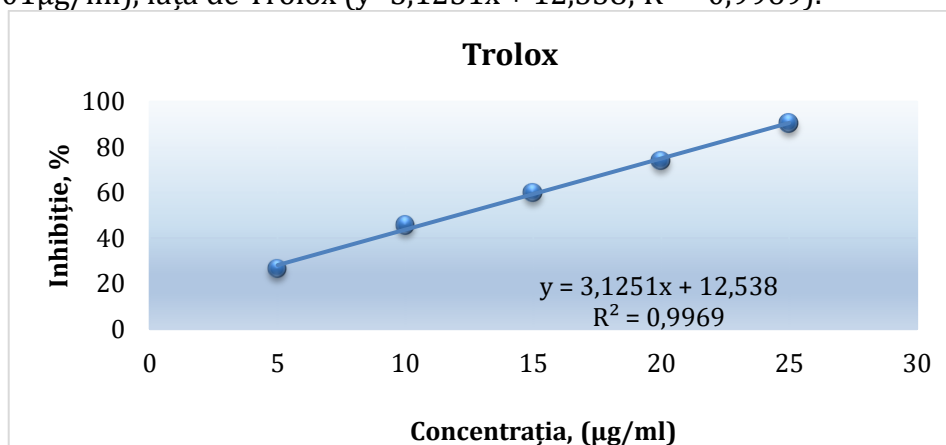


Figura 2. Activitatea antioxidantă pentru Trolox

Prin metoda de neutralizare a radicalului ABTS ●+, extractul de *A. eupatoria* manifestă activitate antioxidantă, cu $59,18 \pm 0,30 \mu\text{M TEAC /g}$, iar capacitatea de chelare a fierului, realizată în comparație cu EDTA, prezintă de asemenea activitate antioxidantă înaltă în extract ($88,07 \pm 0,74 \%$), rezultate ce încurajează efectuarea studiilor ulterioare pentru extractul din turiță.

Activitatea antibacteriană și antifungică s-a realizat prin metoda diluției succesive, care a permis determinarea CMI și CMB, utilizând extracte în concentrații: 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078 mg/ml. Valoarea CMB este cea mai mică concentrație de compus care reduce numărul de colonii până la 99,9. Astfel, rezultatele denotă activitatea antibacteriană cu valori semnificative a extractului de turiță împotriva tulpinilor Gram-pozitive: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CMI- 0,156 și CMB-0,625 mg/ml) și împotriva tulpinii *Bacillus cereus* ATCC 11778 (CMI-0,312 și CMB-0,625 mg/ml). Împotriva tulpinii Gram-negative: *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 extractul de asemenea prezintă activitate antibacteriană în concentrație (CMI-2,5; CMB-5 mg/ml) și nu prezintă activitate antibacteriană împotriva tulpinii Gram-negative *Escherichia coli* ATCC 25922. Extractul nu manifestă activitate antifungică împotriva *Candida albicans* ATCC 10231, în concentrațiile examinate (tabelul 2).

Tabelul 2. Rezultatele activității antibacteriană a extractului din părți aeriene de *Agrimonia eupatoria* (mg/ml)

Extract	Gram-pozitive			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus cereus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Agrimoniae herba</i>	0,156	0,625	0,312	0,625
	Gram-negative			
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Acinetobacter baumannii</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Agrimoniae herba</i>	-	-	2,5	5,0

DISCUȚII

După cum s-a menționat, analiza prin CLÎP prezintă avantaje față de alte metode analitice, deoarece permite identificarea și evaluarea cantitativă a substanțelor, cu precizie ridicată, sensibilitate, o bună separare a compușilor și capacitatea de a analiza componentele individuale în produsele vegetale extractive [24]. Astfel, compușii polifenolici, analizați prin CLÎP în extractul hidroetanolic de *Agrimoniae herba*, sunt constituiți, în mare parte, din taninuri, prin conținut înalt de catechină și epicatechină, flavonoide (rutozidă, quercetol, kaempferol, apigenină și luteolină), cu un conținut mai sport de rutozidă și acizi fenolici. Rezultatele studiului denotă că analiza prin CLÎP poate fi utilizată în identificarea și dozarea compușilor fenolici în extractul de turiță, produs ce a manifestat activitate antioxidantă, confirmată prin metode informative complementare: DPPH, ABTS●+ și capacitatea de chelare a fierului. Faptul, că extractul de *Agrimonia eupatoria* se prezintă activ împotriva bacteriilor Gram-pozitive este un aspect important, deoarece multe bacterii multidrog-rezistente fac parte din această categorie, unde sunt necesari noi agenți chimioterapeutici pentru tratarea bolilor umane sau pentru controlul microorganismelor care provoacă rezistență microbială. Activitatea antibacteriană a extractelor de plante bogate în compuși fenolici s-ar datora și permeabilității ridicate a acestora prin peretele celular bacterian. De asemenea, se constată că compușii fenolici inhibă activitatea proteazelor, care descompun peretele bacterian.

CONCLUZII

1. Compușii polifenolici, analizați prin CLÎP, în extractul hidroetanolic de *Agrimoniae herba* sunt constituiți din taninuri, prin conținut de catechină și epicatechină, flavonoide (rutozidă, quercetol, kaempferol, apigenină și luteolină) și acizi fenolici (clorogenic, cafeic, elagic, cicoric).
2. Activitatea antioxidantă a extractului de *Agrimoniae herba* realizată prin metode complementare: DPPH, ABTS●+, capacitatea de chelare a fierului, încurajează efectuarea studiilor ulterioare pentru extractul din turiță.
3. Produsele vegetale cu proprietăți antimicrobiene prezintă interes pentru cercetarea științifică, pentru că microorganismele continuă să reprezinte una dintre provocările pentru sănătate, prin dezvoltarea rezistenței microorganismelor la antimicrobiene, iar extractul de *Agrimonia eupatoria* a confirmat activitate antibacteriană față de bacterii Gram-pozitive și Gram-negative.
4. *Agrimonia eupatoria* poate servi ca sursă de materie primă în industria farmaceutică în scopul obținerii de produse fitoterapeutice noi cu potențial antibacterian și antioxidant, cu aplicare ulterioară în practica medicală.

MULȚUMIRI

Acest studiu a fost susținut de Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” prin Proiectul: Dezvoltarea de noi produse farmaceutice din materie primă locală (Nr. 080301).

BIBLIOGRAFIE.

1. Marin A. A review study on the pharmacological effects and mechanism of action of tannins. In: *European Journal of pharmaceutical and medical research*, 2021, (8), p. 5–10.
2. Ecor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. In: *Front Pharmacol.*, 2013, 4, p.177–182. doi: [10.3389/fphar.2013.00177](https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177).
3. Giada M. Food phenolic compounds: Main classes, sources and their antioxidant power. In *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases*. Rijeka, Croatia, 2013, p. 87 –112.
4. Bertelli A. *et al.* Polyphenols: From Theory to Practic. In: *Foods*, 2021. doi:[10.3390/foods10112595](https://doi.org/10.3390/foods10112595).
5. Juca M. *et al.* Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. In: *Natural Product Research*, 2018, 34 (5), p.1–14. doi:[10.1080/14786419.2018.1493588](https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1493588).
6. Santos T. *et al.* Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Analgesic Activities of *Agrimonia eupatoria* L. Infusion. In: *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2017 .doi: [10.1155/2017/8309894](https://doi.org/10.1155/2017/8309894).
7. Ivanova D., Vankova D., Nashar M. *Agrimonia eupatoria* tea consumption in relation to markers of inflammation, oxidative status and lipid metabolism in healthy subjects. In: *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2013, 119 (1), p. 32–37. doi: [10.3109/13813455.2012.729844](https://doi.org/10.3109/13813455.2012.729844).
8. Granica S. The phytochemical investigation of *Agrimonia eupatoria* L. and *Agrimonia procera* Wallr. as valid sources of *Agrimoniae herba*-The pharmacopoeial plant material. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, p. 272–279
9. Correia H *et al.* Polyphenolic profile characterization of *Agrimonia eupatoria* L. by HPLC with different detection devices. In: *Biomedical Chromatography*. 2006, 20(1), p. 88 – 94. doi: [10.1002/bmc.533](https://doi.org/10.1002/bmc.533).
10. Ciobanu N., Cojocaru-Toma M. *et al.* Evaluation of polyphenolic profile and antioxidant activity of some species cultivated in the Republic of Moldova. In: *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, Moscow 13 (3), 2019, p. 441– 447, ISSN: 1306-3057.
11. Cojocaru-Toma M., Ancuceanu R., Soloviov M. Spectrophotometric analysis of flavonoids in herbal products and extracts from *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba*. In: *The Romanian*

- National Congress of Pharmacy – 17th edition*, 2018, Bucharest, Romania, Filodiritto Editore-Proceedings, p. 58 – 63. ISBN 978-88-85813-28-1.
12. Cojocaru-Toma M., Parii S., Nicolai E. Determinarea toxicității acute a extractelor obținute din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba*: studiu experimental. In: *Moldovan Journal of Health Sciences*. Chișinău, R. Moldova, nr. 2, vol.16, 2018, p. 35 – 43, ISSN 2345-1467.
 13. Cojocaru-Toma M., Ancuceanu R., Dinu M., Ciobanu N., Ciobanu C., Cotelea T., Jian M., Cobzac V., Nacu V. Viability and cytotoxicity evaluation on isolated hepatocytes of some species rich in polyphenolic compounds. In: *Advanced Nano-Bio Materials and Devices*. 2020, 4(2), p. 580 –585. ISSN: 2559-1118.
 14. EMA. *Agrimoniae herba* - herbal medicinal product. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/agrimoniae-herba>.
 15. Naczki, M., Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. In: *J. Chromatogr.*, 2004, p. 95 –111.
 16. Dent M. *et al.* The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in dalmatian wild Sage (*Salvia officinalis* L.) extracts, 2013. In: *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), p. 84 – 91.
 17. Zeliou K. *et al.* Optimized and Validated HPLC Analysis of St. John's Wort Extract and Final Products by Simultaneous Determination of Major Ingredients. In: *Journal of Chromatographic Science*, Volume 55, 2017, p. 805-812, <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmx040>.
 18. Middleton E., Kandaswami C.,Theoharides T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. In: *Pharmacology Review* 2000 (52), p. 673.
 19. Martin M, Guiochon G. Effects of high pressure in liquid chromatography. In: *J. Chromatogr. A*. 2005: 16 –38.
 20. Coscun O. Separation techniques: Chromatography, 2016. DOI:[10.14744/nci.2016.32757](https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757).
 21. Naczki, M., Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. In: *J. Chromatogr. A* 2004, 1054, p. 95 –111.
 22. Cojocaru-Toma M., Ancuceanu R., Dinu M., Ciobanu N. *et al.* Phytochemical study and antioxidant activity for extracts of some species cultivated in the Republic of Moldova. In: *Матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції „Ліки- людині”*, Kharkiv, Ucraina, 2020, c. 10 –15. ISSN 2412-0456.
 23. Burduniuc O. Produse inovative cu acțiune antifungică asupra unor agenți cauzali ai micozelor umane. *Rezumatul tezei de doctor*. Chișinău, 2023, 50 p.
 24. Wang J. *et al.* HPLC determination of phenolic compounds in different solvent extracts of mulberry leaves and antioxidant capacity of extracts. In: *International Journal of Food Properties*, 2021, <https://doi.org/10.1080/10942912.2021.1904980>.

AUTHOR'S ORCID

Maria Cojocaru-Toma

<https://orcid.org/0000-0002-8255-9881>