

STUDII PRECLINICE ȘI CLINICE

EVALUAREA TOXICITĂȚII ACUTE a extractului polifenolic și poliholozidic din *Cyani herba*

Eugeniu Nicolai,¹ Tatiana Chiru,² Parii Sergiu,¹ Anatol Nistreanu,¹⁻² Vladimir Valica¹

IP USMF "Nicolae Testemițanu", Centrul Științific în Domeniul Medicamentului¹
IP USMF "Nicolae Testemițanu", Catedra Farmacognozie și Botanică Farmaceutică²

Rezumat. În cadrul Catedrei Farmacognozie a USMF "Nicolae Testemițanu" a fost realizat un extract polifenolic și unul poliholozidic din părți aeriene de albăstriță *Cyani herba*. Scopul studiului a constituit: Determinarea toxicității acute a extractului polifenolic și poliholozidic din *Cyani herba*. Rezultatele obținute ne-a permis să stabilim ca LD₀ pentru ambele extracte din Ch a constituit 4000 mg/kg (doza maxim administrată) la administrare enterală, dozele LD 25%, LD 50%, LD 100% nefiind stabilite. Constatăm toxicitatea minimă extractelor polifenolic și poliholozidic din părți aeriene de albăstriță *Cyani herba*.

Cuvinte cheie: toxicitate acută, *Cyani herba*, extracte.

Abstract.

EVALUATION OF ACUTE TOXICITY OF POLYPHENOLS AND POLYSACCHARIDES EXTRACTS OF *CENTAUREA CYANUS L.*

A polyphenolic extract and one polyholosidic from of aerial parts of *Cyani herba* were made at the Department of Pharmacognosy of SUMPH "Nicolae Testemițanu". The aim of the study was: Determination of acute toxicity of polyphenols and polysaccharides extract of *Cyani herba*. The obtained results shows that enteral LD₀ for both extracts (the minimal administrated dose) was 4000 mg/kg at enteral administration, LD 25%, LD 50%, and LD 100% haven't been established. The obtained LD value classifies the studied plant extracts as slightly toxic. The results suggest that the polyphenols and polysaccharides extracts of the aerial parts of *Centaurea cyanus L.* are relatively safe toxicologically.

Keywords: acute toxicity, *Cyani herba*, extracts.

Centaurea cyanus L. este o plantă anuală, ce crește spontan în Europa și Asia de est, îndeosebi prin semănăturile de cerealiere. Constituenții chimici principali ai plantei sunt derivații flavonoidici: apigenina-4'-O-(6-O-malonil-glucozida)-7-O-glucuronida, apigenina-4-O-glucozida, cosmosiina, apiina, metil-apigenina și metil-vitexina, centaurocianina, cianidina, rutozida, izoramnetina, izoramnetina-7-O-glucozida, naringenina și naringenina-7-O-gluco-ramnozida; derivații fenilcarboxilici (acizii *cis-* și *trans-*cafeic, protocatehic și clorogenic, acizii *p*-hidroxi-benzoic, *p*-cumaric, vanilic, siringic, ferulic, salicilic, benzoic, *cis-/trans-*sinapic); precum și poliholozidele. Constituenții respectivi îi conferă plantei un spectru larg de acțiune: antiinflamator, antioxidant, imunologic, gastroprotectiv, astringent, antibacterian și antiviral (1,2).

Florile de *C. cyanus L.* au acțiune antiinflamatoare și dezinfectantă. Infuzia este pe larg întebuițată în dermatologie și cosmetologie. Se aplică comprese pe ochi sau cataplasme în caz de conjunctivite, blefarite, hemeralopie ("orbul găinilor"), astenie vizuală. În fitoterapia europeană inflorescențele de albăstrele sunt utilizate în tratamentul inflamațiilor oculare minore (3). De asemenea, atenuează mult cearcanele, se recomandă pentru tonifierea tenului, prin hidratare se opun apariției ridurilor mici care se formează la coada ochiului [3,4]. La nivel local, albăstrelele

hidratează, elimină substanțele toxice și substanțele de degradare [2].

Sucul și extractul obținut din părți aeriene și frunze de *C. cyanus L.* posedă acțiune cicatrizantă și sunt efective în tratarea plăgilor și fracturilor [3,4]. Decoctul și infuzia se utilizează în ginecologie pentru normalizarea ciclului menstrual. Infuzia din fori posedă activitate galactogenă. În componența speciilor se utilizează pentru tratarea nefrolitiaziei, boli a rinichilor, organelor tractului gastro-intestinal, bolii hipertentice; în caz de dermatoze alergice la copii (diateză, exemă, neurodermită, inclusiv complicată cu astm bronșic)

În cadrul Catedrei Farmacognozie a USMF "Nicolae Testemițanu" a fost realizat un extract polifenolic și unul poliholozidic din părți aeriene de albăstriță *Cyani herba*.

Scopul studiului: Determinarea toxicității acute a extractului polifenolic și poliholozidic din *Cyani herba (Ch)*.

Material și metode

Metoda de obținere a extractului polifenolic

Părțile aeriene uscate și pulverizate se extrag timp de 20 min cu soluție hidroalcoolică 80% (1:100, m/v), la temperatura camerei și agitare continuă. Extractul se filtrează prin hârtia Whatman n.2 sub vid, utilizând pâlnia Buchner. Reziduu se reextrage de 4 ori cu etanol 80%, repetând

toată procedura. Solventul se evaporă la presiune redusă, temperatură de 40°C și se păstrează la -4°C până la analiză [5].

Metoda de obținere a extractului poliholozidic

Părțile aeriene uscate și pulverizate se extrag timp de 1 oră cu apă purificată (1:15, m/v) la 95°C, agitare permanentă. Extractul se filtrează și reziduu se reextrage, respectând aceleași condiții. Filtratele se combină și se concentrează până la 1/10 volum. La concentrat se adaugă alcool etilic 96% (1:10, v/v). Soluția obținută se supune centrifugării. Sedimentul obținut se menține în dulapul de uscare timp de 20 min la temperatura de 40°C [6]*.

Toxicitate acută a extractelor din Ch. a fost determinată conform „Recomandărilor metodice pentru studierea toxicității generale a substanțelor farmacologice”, aprobate de Comitetul Farmacologie de Stat al MS din F.Rusă în 2005 (7) pe un lot de 84 șoriceii (42 masculi și 42 femele) cu masa corporală între 18-26 g și vârsta cuprinsă între 8-12 săptămâni. Atât masa corporală cât și vârsta animalelor au corespuns cu cerințele din recomandările metodice.

Animalele au fost obținute din aceeași sursă și menținute în condițiile de viață a laboratorului (cutii standarde de masă plastică) pentru aclimatizare. Condițiile de trai și alimentare au corespuns cerințelor sanitare și normelor de alimentare. Pentru utilizarea apei au fost stabilite autoape-ducte. Animalele nu au primit hrană cu 12 ore înainte de inițierea experienței și pe parcursul ei. În dimineața zilei destinate experimentării șoriceii au fost cântăriți și repartizați în loturi omogene câte 3 masculi și 3 femele conform masei corporale.

Pentru aclimatizare, animalele s-au aflat timp de 3 zile în condițiile de viață ale laboratorului. Conform recomandărilor metodice, animalele n-au primit hrană 12 ore până la includerea în experiență.

Preparatele au fost diluate în volume constante de soluție fiziologică de 0,9% (câte 0,4-1 ml pentru fiecare șoricel la administrarea per os –intra-gastral prin gavaj și câte 0,2-0,5 ml la injectare intraperitoneală). Pentru testarea toxicității acute la administrarea intraperitoneală s-a utilizat doza de 50% din doza utilizată enteral, cu supravegherea ulterioară a animalelor. Calcularea dozei extractelor și cantității de lichid maxim admisibile pentru administrarea enterală și intraperitoneală s-a efectuat conform recomandărilor metodice.

Pentru stabilirea dozelor toxice, Ch a fost administrat șoricelilor enteral prin gavaj succesiv în doze-teste de 50, 250 mg/kg masă corporală. Animalele au fost supravegheate timp de 7 zile. Ulterior s-a recurs la administrarea preparatului în doze 500, 2000, 4000 mg/kg.

Doze mai mari de 4000 mg/kg nu au fost folosite din cauza necesității unui volum mai mare de soluție fiziologică, fapt ce nu corespundea recomandărilor metodice.

În timpul observațiilor s-a înregistrat comportamentul animalelor, activitatea motorie, coordonarea mișcărilor, reacția la excitanți fizici (lumină, zgomot), funcția respiratorie, starea pielii și a mucoaselor. De asemenea au fost

înregistrate timpul apariției fenomenelor de intoxicație și decesul animalelor. Vizual s-a determinat tabloul clinic al intoxicației.

Animalele decedate din fiecare lot au fost disecate în mod separat, pentru efectuarea studiului organelor interne și confirmarea modificărilor obținute în experiență.

Rezultatele au fost prelucrate statistic după metoda Kurber, Prozorovski.

Rezultate

Administrarea enterală

La administrarea dozelor test și supravegherea timp de 7 zile nu s-au constatat modificări în comportamentul animalelor și nici decesul lor.

Administrarea Ch în doze de 500, 2000, 4000 mg/kg s-a caracterizat printr-o perioadă de hipodinamie și reducere a reacției la stimulii exogeni. Animalele au revenit la starea inițială pe parcursul a primelor 4 ore (500 mg/kg) și 24 ore (pentru 2000, 4000 mg). Deces nu s-a înregistrat.

Tab 1. Toxicitatea acută a extractului polifenolic din Cyani herba la administrarea enterală

Doze	masculi		femele		Decesul animalelor	
	N animale	deces	N animale	deces	N animale	Deces, %
500 mg/kg	3	-	3	-	6	0
2000 mg/kg	3	-	3	-	6	0
4000 mg/kg	3	-	3	-	6	0

Tab 2. Toxicitatea acută a extractului poliholozidic din Cyani herba la administrarea enterală

Doze	masculi		femele		Decesul animalelor	
	N animale	deces	N animale	deces	N animale	Deces, %
500 mg/kg	3	-	3	-	6	0
2000 mg/kg	3	-	3	-	6	0
4000 mg/kg	3	-	3	-	6	0

Administrarea intraperitoneală

Extract polifenolic La administrarea dozei de 250 mg/kg nu s-au constatat modificări în comportamentul animalelor și nici decesul lor. La administrarea dozelor 500, 2000, 4000 mg/kg la câte 1 animal din fiecare lot pentru extractul polifenolic la animale s-a constatat o diminuare a activității motorii, cu reacție redusă, apoi din ce în ce mai slabă la stimulii exogeni, cu dezvoltarea unei stări terminale (gasping) și decesul animalelor (1 femela) în decurs de 4 ore la doza de 4000 mg/kg și de 12 ore la doza de 500 (1 femela), și 48 ore - 2000 mg/kg (1 mascul). Convulsii s-au

constatat ocazional. Starea soriceilor care au supraviețuit la administrarea dozelor 500, 2000, 4000 mg/kg s-a caracterizat printr-o perioadă de hipodinamie și reducere a reacției la stimulii exogeni. Animalele au revenit la starea inițială pe parcursul a 48 ore.

La examinarea macroscopică a organelor interne la animalele decedate nu am constatat modificări vizibile.

Extract poliholozidic. La administrarea dozei de 250 mg/kg nu s-au constatat modificări în comportamentul animalelor și nici decesul lor. La administrarea dozelor 500, 2000, 4000 mg/kg la câte 2 animale din fiecare lot pentru extractul poliholozidic s-a constatat o diminuare a activității motorii, cu reacție redusă, apoi din ce în ce mai slabă la stimulii exogeni, cu dezvoltarea unei stări terminale (gasping) și decesul animalelor (1 femela, 1 mascul) în decurs de 4-12 ore la doza de 4000 mg/kg; de 24 ore la doza de 500 mg/kg (1 mascul), și 36-48 ore - 2000 mg/kg (1 femela, 1 mascul). Convulsii s-au constatat ocazional. Starea soriceilor care au supraviețuit la administrarea dozelor 500, 2000, 4000 mg/kg s-a caracterizat printr-o perioadă de hipodinamie și reducere a reacției la stimulii exogeni. Animalele au revenit la starea inițială pe parcursul a 48 ore.

La examinarea macroscopică a organelor interne la animalele decedate nu am constatat modificări vizibile.

Discuții, concluzii. Rezultatele obținute ne-a permis să stabilim ca LD₀ pentru ambele extracte din Ch a constituit 4000 mg/kg (doza maxim administrată) la administrare enterală, dozele LD 25%, LD 50%, LD 100% nefiind stabilite.

La administrare parenterală LD 0% pentru extractul polifenolic și poliholozidic din Ch fiind de 250 mg/kg. Procentajul maxim de letalitate LD 17% pentru administrarea parenterală a fost stabilită la dozele 500, 2000, 4000 mg/kg pentru extractul polifenolic. Procentajul maxim de letalitate LD 34% pentru administrarea parenterală a fost stabilită la dozele 2000, 4000 mg/kg pentru extractul poliholozidic. Astfel matematic s-a calculat posibila LD

25% pentru extractul poliholozidic de 1470 mg/kg pentru administrare parenterală.

În concluzie putem constata toxicitatea acută minimă a extractelor polifenolic și poliholozidic din părți aeriene de albăstriță *Cyani herba*.

Tab 3. Toxicitatea acută a extractului polifenolic din *Cyani herba* la administrarea parenterală

Doze	masculi		femele		Decesul animalelor	
	N animale	deces	N animale	deces	N animale	Deces, %
250 mg/kg	3	-	3	-	6	0
500 mg/kg	3	-	3	1	6	0
2000 mg/kg	3	1	3	-	6	17
4000 mg/kg	3	-	3	1	6	17

Tab 4. Toxicitatea acută a extractului poliholozidic din *Cyani herba* la administrarea parenterală

Doze	masculi		femele		Decesul animalelor	
	N animale	deces	N animale	deces	N animale	Deces, %
250 mg/kg	3	-	3	-	6	0
500 mg/kg	3	1	3	-	6	17
2000 mg/kg	3	1	3	1	6	34
4000 mg/kg	3	1	3	1	6	34

Bibliografie

1. WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS). 2010, p. 201-227.
2. Monya M., Sabău M., Racz G. 1968 Antibiotic effect of extracts from *Centaurea*-species. *Planta Med.* 16, p. 58-62.
3. Bruneton J., 1995. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Tec-Doc Lavoisier, Paris, New York, p. 310-311.
4. Pirvu L. și colab., *Centaurea cyanus* L.-herba, chemical composition and therapeutical potential. Proceeding of the International Symposium „New research in biotechnology” USAMV, Bucharest, Romania, 2008, p. 187-194.
5. Dae-Ok Kim and Chang Y. Lee. *Extraction and isolation of polyphenolics*. In: Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2002; Unit 11.2.1-11.2.12. John Wiley & Sons, Inc.
6. 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.
7. Хабриев Р.У. и соавт. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Москва, 2005, 827 стр.