



ARTICOL DE CERCETARE

Determinarea toxicității acute a extractelor obținute din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba*: studiu experimental

Maria Cojocaru-Toma^{1,3}, Sergiu Parii², Eugeniu Nicolai², Maria-Mirabela Toma⁴, Tudorița Gherman³, Serafim Romașcu³

¹Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

²Centrul Științific al Medicamentului, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

³Centrul Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

⁴Facultatea de Medicină, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.

Data primirii manuscrisului: 06.03.2018

Data acceptării spre publicare: 21.05.2018

Autor corespondent:

Maria Cojocaru-Toma, dr. șt. farm., conf. univ.

Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: m.cojocaru-toma@usmf.md

RESEARCH ARTICLE

Determination of acute toxicity for extracts of *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba*: experimental study

Maria Cojocaru-Toma^{1,3}, Sergiu Parii², Eugeniu Nicolai², Maria-Mirabela Toma⁴, Tudorita Gherman³, Serafim Romascu³

¹Chair of pharmacognosy and pharmaceutical botany, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

³Scientific Center of Medicine, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

³Scientific Center of Medicinal Plants Cultivation “Nicolae Testemitanu”, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

⁴Faculty of Medicine, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.

Manuscript received on: 06.03.2018

Accepted for publication on: 21.05.2018

Corresponding author:

Maria Cojocaru-Toma, PhD, assoc. prof.

Chair of pharmacognosy and pharmaceutical botany

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy

165, Ștefan cel Mare și Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004

e-mail: m.cojocaru-toma@usmf.md

Ce nu este, deocamdată, cunoscut la subiectul abordat

Până în prezent nu a fost determinată toxicitatea acută a extractelor obținute din părțile aeriene de turiță (*Agrimoniae herba*) și părți aeriene de cicoare (*Cichorii herba*) prin metoda dozelor fixe, cu stabilirea clasei toxice, conform TG 423 (*Acute Toxic Class Method*).

Ipoteza de cercetare

Plantele din colecția Centrului Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale al USMF „Nicolae Testemițanu”, care sunt bogate în compuși fenolici ce servesc drept surse de antioxidanți, manifestă toxicitate acută redusă, rezultate ce ar servi ca premiză pentru continuarea studiilor preclinice și clinice de determinare a inofensivității și eficacității lor.

Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Determinarea toxicității acute a extractelor obținute din părțile aerine de turiță (*Agrimoniae herba*) și părțile aeriene de cicoare (*Cichorii herba*) prin metoda dozelor fixe, denotă toxicitate acută redusă, atât la administrarea enterală cât și parenterală (clasa de toxicitate 5), iar produsele pot servi ca surse valoroase în obținerea de noi fitopreparate.

What is not known yet, about the topic

Until the present, has not been determined the acute toxicity of the extracts obtained from aerial parts of agrimony (*Agrimoniae herba*) and aerial parts of chicory (*Cichorii herba*) by the fixed dose method with the establishment of the toxic class, according to TG 423 (*Acute Toxic Class Method*).

Research hypothesis

Plants from the collection of the Scientific Center of Medicinal Plants Cultivation Nicolae Testemitanu SUMPh, rich in phenolic compounds, which serve as sources of antioxidants, manifest the reduced acute toxicity, results that would serve as a prerequisite for further preclinical and clinical studies in determination of their safety and efficacy.

Article's added novelty on this scientific topic

Determination of acute toxicity of extracts of (*Agrimoniae herba*) and (*Chicorii herba*), denote low acute toxicity, both enteral and parenteral (toxicity class 5), and the species can serve as valuable sources in obtaining of new phytopreparates.

Rezumat

Introducere. Pornind de la ideea că una din direcțiile actuale de dezvoltare a industriei farmaceutice este obținerea și utilizarea extractelor din plante medicinale cu conținut de diverse principii active, lucrarea dată prezintă cercetări derulate în scopul determinării toxicității acute al unor produse vegetale: *Argimoniae herba*, *Cichorii herba*, produse cu proprietăți antioxidante.

Material și metode. Produsele vegetale *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* au fost selectate din colecția Centrului Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale USMF „Nicolae Testemițanu” conform recomandărilor farmaceutice. Extracția principiilor active s-a efectuat cu etanol:apă 80%, până la epuizarea produselor vegetale, cu concentrarea ulterioară a soluțiilor extractive obținute cu ajutorul unui evaporator rotativ. Conținutul de polifenoli și acțiunea antioxidantă s-au realizat prin metode spectrofotometrice. Toxicitatea acută a fost determinată prin metoda dozelor fixe, cu stabilirea clasei toxice, prin administrare intragastrală și intraperitoneală, conform TG 423 (*Acute Toxic Class Method*), recomandată de Organizația Economică pentru Cooperare și Dezvoltare și după metoda Kerber, pe 132 de șoricei albi de laborator linia „Wistar” (66 masculi, 66 femele), în urma obținerii acordului Comitetului de Etică nr. 42 din 11.05.2016.

Rezultate. Părțile aeriene de turiță și de cicoare manifestă remarcabile proprietăți antioxidante: *Agrimoniae herba* (IC₅₀ = 45,56 μg/ml), *Cichorii herba* (IC₅₀ = 173,08 μg/ml), cu o corelare în conținutul total de polifenoli pentru turiță de 6,07% și, respectiv, cicoare – 2,88%. Determinarea toxicității acute denotă o toxicitate redusă atât la administrarea enterală, cât și parenterală: (DL_{25%} = 4412 mg/kg pentru extractul din *Agrimoniae herba*); (DL_{50%} este >5000 mg/kg pentru extractele din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba*), estimată conform metodei TG 423 (*Acute Toxic Class Method*), ce caracterizează extractele studiate ca fiind, practic, inofensive.

Concluzii. Rezultatele obținute ne-au permis să stabilim că la doza maximă administrată în cadrul experimentului, care a corespuns cu 6000 mg/kg pentru extractele din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* la administrarea enterală și intraperitoneală, pentru *Cichorii herba* nu s-a constatat doza letală (DL=0%), cu clasa de toxicitate 5, fapt ce poate servi ca premiză pentru continuarea studiilor preclinice și clinice de determinare a inofensivității și eficacității pentru produsele *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba*.

Cuvinte cheie: plante medicinale, produse vegetale, extracte, toxicitate acută.

Introducere

Interesul pentru antioxidanții naturali, în special, pentru cei proveniți din plante medicinale, a crescut în ultimii ani, inclusiv, prin multiple studii și publicații.

Cicoare (*Cichorium intybus* L.); părți aeriene de cicoare (*Cichorii herba*); fam. *Asteraceae*. Remarcăm că părțile aerine de cicoare conțin cicoarină, arginină, acid cioric și principii amare. Întreaga plantă conține un latex, al cărui constituenț major

Abstract

Introduction. Starting from the idea that one of the current directions of development of the pharmaceutical industry is the obtaining and uses of extracts from medicinal plants containing various active principles, this paper presents research carried out in order to determine the acute toxicity of some vegetable products: *Argimoniae herba*, *Cichorii herba*, products with antioxidant properties.

Material and methods. The vegetable products *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba* from the collection of the Scientific Center of Medicinal Plants Cultivation of the *Nicolae Testemitanu* SUMPh were collected according to pharmacopoeial recommendations. The extraction of the active principles was done using ethanol:water 80%, until the exhausted of vegetable products, with the subsequent concentration of the extractive solutions by means of a rotary evaporator. Acute toxicity was determined by the fixed-dose method with the establishment of the toxic class by enteral and intraperitoneal administration, according to TG 423 (*Acute Toxic Class Method*) recommended by Organization for Economic Cooperation and Development by the Kerber method, on 132 laboratory white mice line “Wistar” (66 males, 66 females), following the agreement of the Ethics Committee no. 42 from 11.05.2016.

Results. The aerial parts of agrimony and chicory exhibit remarkable antioxidant properties: *Agrimoniae herba* (IC₅₀ = 45.56 μg/ml), *Cichorii herba* (IC₅₀ = 173.08 μg/ml), with a correlation in total contain of polyphenols for agrimony 6.07% and respectively chicory 2.88%. The determination of acute toxicity indicate low toxicity both for enteral and intraperitoneal administration: (DL_{25%} = 4412 mg/kg for extract of *Agrimoniae herba*); (DL_{50%} > 5000 mg/kg for extracts of *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba*), estimated according to the method TG 423 (*Acute Toxic Class Method*) which characterizes the studied extracts as practically inoffensive.

Conclusions. The obtained results allowed us to establish that the maximum dose administrated in the experiment which corresponded to 6000 mg/kg for extracts of *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba* for enteral and intraperitoneal administration, for *Cichorii herba* did not found the lethal dose (DL=0%), with toxicity class 5, which may serve as a prerequisite for further preclinical and clinical studies to determine the inoffensivity and efficacy for the products *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba*.

Key words: medicinal plants, vegetable products, extracts, acute toxicity.

Introduction

Interest in natural antioxidants, especially those derived from medicinal plants, has increased in recent years, including through multiple studies and publications.

Chicory (*Cichorium intybus* L.); aerial parts of chicory (*Cichorii herba*); fam. *Asteraceae*. We note that the aerial parts of chicory contain chicorin, arginine, cichoric acid and bitter principles. The entire plant contains latex, whose major constituent is inulin. Besides inulin, there also are contained sug-

este inulina. Pe lângă inulină, se conțin și zaharuri, substanțe tanante, uleiuri volatile, pectine, rășine. Planta servește și ca sursă de vitamine: A, C, E, K, P, PP. Flavonoidele constituie cca 3%: luteol, quercetol, riboflavină. În părțile aeriene domină: cicorina, arginina, colina; se întâlnesc, de asemenea, microelemente: Fe, P, Ca. În părțile subterane predomină substanțele triterpenice amare, fructoza, taninuri și ulei volatil.

Principiile active din cicoare stimulează digestia, detoxifică organismul, scade colesterolul și glicemia. Prin faptul că sunt anorexigene și laxative, cicoarea este indicată în obezitate. Preparatele din cicoare se recomandă în cazul afecțiunilor digestive: gastrite, hepatite, colecistite, spasme hepato-biliare, constipații, helmintiaze, hemoroizi, ateroscleroză, diabet. De asemenea, cicoarea se dovedește eficientă în perioada de convalescență, poate fi administrată sub formă de infuzie, sirop, decoct, comprimate [1, 2, 3].

Turiță (*Agrimonia eupatoria* L.); părți aeriene de turiță (*Agrimoniae herba*); fam. *Rosaceae*. În părțile aeriene de turiță au fost identificate substanțe tanante, uleiuri volatile, vitamina K, acizi organici și flavonoide, dintre care: quercetrina, kaempferolul, luteolina și apigenina.

Turița este cunoscută de pe vremea vechilor egipteni, posedă un efect puternic curativ în patologii hepatice, gastrointestinale, afecțiuni ale căilor biliare, prin conținutul de taninuri și flavonoide. Menționăm că turița este un bun regenerant, dacă este administrată sub formă de infuzie și decoct. Poate fi utilizată în patologii hepatice și în combinație cu alte plante medicinale [1, 4].

Scopul acestei lucrări a constat în determinarea toxicității acute a extractelor obținute din *Argimoniae herba* și *Cichorii herba*, selectate din colecția Centrului Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale (CȘCPM) USMF „Nicolae Testemițanu”.

Material și metode

Cercetările experimentale au fost efectuate în cadrul subdiviziunilor USMF „Nicolae Testemițanu”: Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică, Laboratorul de evaluare preclinică și clinică a medicamentelor al Centrului Științific al Medicamentului.

Produsele vegetale au fost recoltate din colecția Centrului Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale. Produsele vegetale: *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* s-au recoltat în funcție de natura produselor vegetale, pe întreaga perioadă de înflorire, s-au uscat și condiționat conform recomandărilor farmaceutice, în scopul studiilor chimice și determinării toxicității acute.

Extractele au fost obținute prin extracție repetată a produselor vegetale pulverizate: *Argimoniae herba* et *Cichorii herba*, cu un amestec etanol:apă (80%), timp de o jumătate de oră la fiecare etapă de extracție, până la epuizarea produselor vegetale, cu concentrarea soluțiilor extractive obținute la temperatura de 40°C, cu ajutorul unui evaporator rotativ. Conținutul de polifenoli a fost dozat prin metoda spectrofotometrică, cu reagentul Folin-Ciocalteu [5, 6], iar acțiunea antioxidantă s-a realizat prin testul DPPH, după Trolox [7].

Din extractele de *Agrimoniae herba* et *Cichorii herba*

ars, tannins, volatile oils, pectin, resins. The plant also serves as a source of vitamins: A, C, E, K, P, PP. Flavonoids make up about 3%: luteol, quercetol, riboflavin. The aerial parts are dominated by chichorin, insulin, arginine, choline, and microelements: Fe, P, Ca; the roots are rich in bitter triterpenic substances, fructose, tannins and volatile oil.

Active principles of chicory stimulate digestion, detoxify the body, decrease the level of cholesterol and glucose in blood, and because they are anorexic and laxative, chicory is indicated in obesity. Chicory preparations are recommended for digestive diseases: gastritis, hepatitis, cholecystitis, hepatobiliary spasms, constipation, helminthiasis, hemorrhoids, atherosclerosis, and diabetes. Also, being effective during convalescence, chicory can be given as infusion, syrup, decoct, tablets [1, 2, 3].

Agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.); aerial parts of agrimony (*Agrimoniae eupatoriae herba*); fam. *Rosaceae*. In the aerial parts of agrimony has been identified tannins, volatile oils, vitamin K, organic acids and flavonoids, of which: quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin.

The agrimony is known since the time of the ancient Egyptians, possessing a powerful curative effect in liver, gastrointestinal, and bile duct diseases, by the content of tannins and flavonoids. We mention that the agrimony is a good regenerator, given as an infusion and decoct. Can be used in liver pathologies and in combination with other medicinal plants [1, 4].

The purpose of this work is to determine the acute toxicity of the extract obtained from *Argimoniae herba* and *Cichorii herba*, collected from the collection of the Scientific Center of Medicinal Plants Cultivation *Nicolae Testemitanu* SUMPh.

Material and methods

Experimental researches were carried out within the subdivisions of *Nicolae Testemitanu* SUMPh: Chair of pharmacognosy and pharmaceutical botany, Laboratory of preclinical and clinical evaluation of medicines of the Scientific Center of Medicine, vegetable products were harvested from the collection of the Scientific Center of Medicinal Plants Cultivation.

The vegetable products: *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba* were harvested according to the nature of the vegetable products, throughout the flowering period, has been dried and conditioned according to pharmacopoeial recommendations, for the purposes of chemical studies and determination of acute toxicity.

The extracts were obtained by repeatedly extracting of the pulverized vegetable products: *Argimoniae herba* and *Cichorii herba*, with a mixture of ethanol: water (80%), for half an hour at each extraction stage, to the depletion of the vegetal products, with the concentration of the extractive solutions obtained at 40°C, with a rotary evaporator. The polyphenol content was dosed by the spectrophotometric method with the Folin-Ciocalteu reagent [5, 6], and the antioxidant action was performed by the DPPH test after Trolox [7].

From the extracts of *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba* were prepared extempore concentrations in respective doses

s-au preparat extempore concentrații în doze respective de 200 mg/kg, 1000 mg/kg, 2000 mg/kg, 4000 mg/kg și 6000 mg/kg. Studiul toxico-farmacologic a fost efectuat în Laboratorul de evaluare preclinică și clinică a medicamentelor al Centrului Științific al Medicamentului USMF "Nicolae Testemițanu" pe 132 de șoricei albi de laborator linia „Wistar” (66 de masculi, 66 de femele), vârsta 12 săptămâni, masa 18-26 gr. La inițierea studiului (120 șoricei – în grupurile experimentale, 12 șoricei – în grupul de control). Pe parcursul experimentului a fost menținut ciclul lumină/întuneric de 12 ore; temperatura 25°C și umiditatea relativă a aerului 60%, menținute constant, cu ajutorul acimatizorului model „Panasonic”. Regimul alimentar standard pentru șoarecii de laborator a fost echilibrat în proteine, glucide, lipide, minerale și vitamine, fiind administrat sub formă de granule și apă *ad libitum*. Condițiile experimentului au corespuns cerințelor pentru studii farmacologice cu implicarea animalelor de laborator [8, 9, 10]. Animalele au fost obținute din aceeași sursă și menținute în mediul laboratorului. Șoriceii au fost cântăriți și repartizați în loturi omogene, câte 3 masculi și 3 femele, conform masei corporale. Animalele nu au primit hrană cu 12 ore înainte de inițierea experienței și 4 ore după administrarea extractelor studiate.

Toxicitatea acută a fost determinată prin metoda dozelor fixe, cu stabilirea clasei toxice conform TG 423 (*Acute Toxic Class Method*), recomandată de Organizația Economică pentru Cooperare și Dezvoltare (OECD) și după metoda Kerber [10, 11].

Extractele din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* și soluția de referință (sol. NaCl 0,9%) au fost administrate șoriceilor enteral, prin gavaj, și intraperitoneal. Cantitatea de lichid administrat a fost calculată în funcție de masa individuală a animalelor de laborator, cântărite înainte de experiment (0,3 ml/g). Pentru stabilirea toxicității acute, extractele au fost administrate șoriceilor enteral, prin gavaj, și intraperitoneal în doze-test de 200 mg/kg, 1000 mg/kg, 2000 mg/kg, 4000 mg/kg și 6000 mg/kg. Dozele mai mari de 6000 mg/kg nu au fost folosite atât în corespundere cu cerințele internaționale, cât și din cauza imposibilității administrării a unui volum mai mare de soluție, acesta fiind contrar recomandărilor metodice [11, 12]. Animalele au fost supravegheate timp de 14 zile.

În timpul observațiilor a fost înregistrat comportamentul animalelor, consumul alimentelor și al apei, activitatea motorie, coordonarea mișcărilor, reacția la excitanți fizici (lumină, zgomot), funcția respiratorie, starea pielii și a mucoaselor. De asemenea, a fost înregistrat timpul apariției fenomenelor de intoxicație și decesul animalelor. Vizual, s-a determinat tabloul clinic al intoxicației. Animalele decedate au fost disecate în mod separat, pentru efectuarea studiului organelor interne și confirmarea modificărilor obținute în experiență.

Rezultate

Rezultatele obținute în urma analizei fitochimice a extractelor din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* prin metoda spectrofotometrică au confirmat prezența compușilor fenolici, după Folin Ciocalteu, cu un conținut de 6,07% pentru turiță și, respectiv, 2,88% pentru cicoare. În calitate de antioxidant standard a fost folosit Trolox, în intervalul de concentrații de

of 200 mg/kg, 1000 mg/kg, 2000 mg/kg, 4000 mg/kg and 6000 mg/kg. The toxic-pharmacological study was evaluated in the Laboratory of preclinical and clinical evaluation of medicines of the Scientific Center of Medicine *Nicolae Testemitanu* SUMPh on 132 mice laboratory line “Wistar” (66 males, 66 females), age 12 weeks, weight 18-26 gr; at initiation of the study (120 mice in the experimental groups, 12 mice in the control group). During the experiment, the 12 hour light/dark cycle was maintained constantly 25°C temperature and 60% relative humidity with the “Panasonic” air conditioner. The standard diet for laboratory mice was balanced in proteins, carbohydrates, lipids, minerals and vitamins and was administered as granules and water *ad libitum*. The conditions of the experiment have been corresponded to the requirements for pharmacological studies involving laboratory animals [8, 9, 10]. The animals were obtained from the same source and maintained in the laboratory environment. The mice were weighed and distributed in homogeneous lots, 3 males and 3 females, according to their body mass. The animals did not receive food 12 hours before the start of the experiment and 4 hours after the administration of studied extracts.

Acute toxicity was determined by the fixed dose method with toxic class setting according to TG 423 (*Acute Toxic Class Method*) recommended by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) and by the Kerber method [10, 11].

The extracts of *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba* and the reference solution (0.9% NaCl) were administered to the mices by enterally way via gavage and intraperitoneal way. The administered amount of liquid was calculated based on the individual mass of laboratory animals weighed before the experiment (0.3 ml/g). To establish the acute toxicity, the extracts were administered to the mices by enterally way via gavage and intraperitoneal way at 200 mg/kg, 1000 mg/kg, 2000 mg/kg, 4000 mg/kg and 6000 mg/kg doses. There were not used greater doses than 6000 mg/kg both in accordance with international requirements and the impossibility of administering a major volume of solution, which did not correspond to the methodological recommendations [11, 12]. The animals were monitored for 14 days.

During the observations, animal behavior, food and water consumption, motor activity, coordination of movements, reaction to physical excitations (light, noise), respiratory function, skin and mucosal status were recorded. Also, there were recorded the time of poisoning phenomena and the death of animals. The symptomatology of intoxication was determined visually. The deceased animals were dissected separately for the study of the internal organs and the confirmation of the changes made in the experience.

Results

The results obtained from the phytochemical analysis of the extracts of *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba*, by the spectrophotometric method has been confirmed the presence of phenolic compounds after Folin Ciocalteu, with a content of 6.07% for agrimony and respectively 2.88% for chicory. As a standard antioxidant was used Trolox in the concentration

5-25 µg/ml, iar prin calcul corelațional, a fost stabilită concentrația de inhibare (IC)50. În rezultatul evaluării capacității de scavenger a extractelor de *Agrimoniae herba*, *Cichorii herba* prin metoda radicalului liber DPPH, s-a determinat o capacitate antioxidantă bună, cu activitatea de peste 50% inhibiție. Activitatea antioxidantă prin testul DPPH denotă faptul că, cu cât IC50 este mai mic, cu atât acțiunea antioxidantă este mai mare: *Agrimoniae herba* (IC50 = 45,557 µg/ml) și *Cichorii herba* (IC50 = 173,08 µg/ml), ce ne-a determinat să continuăm studiile asupra acestor produse prin determinarea toxicității acute.

Rezultatul studiului toxicității acute, determinat prin metoda dozelor fixe cu stabilirea clasei toxice acute conform TG 423 (*Acute Toxic Class Method*), denotă că pe parcursul studiului nu s-au constatat modificări în comportamentul și activitatea motorie spontană a animalelor din grupurile de control și de studiu. Animalele erau în mișcare activă, întrebunțau hrană și apă. Starea mucoaselor și a învelișului cutanat au fost fără schimbări patologice. Blana animalelor avea un aspect îngrijit, lucios, fără focare de alopecie, urina de culoare galbenă deschisă, dinții păstrați, iar mucoasele vizibile erau palide, lucioase, netede. Glandele mamare ale femelelor la palpare fără indurații și fără eliminări. Organele genitale masculine normale exprimate. Deformări sau edeme ale extremităților nu s-au remarcat. Monitorizarea pe parcursul experimentului a procesului de alimentare nu a evidențiat modificări între grupurile cercetate și cele de control. Nu s-au marcat diferențe semnificative în dinamica de greutate corporală între animalele din grupul de studiu și de control. S-a observat o creștere ceva mai mare în greutate la animalele de control, comparativ cu cele experimentale. Explorarea nu purta un caracter statistic semnificativ, ci de tendință. La administrarea substanței de referință și dozei de 200 mg/kg, intragastral și intraperitoneal, și supravegherea timp de 7 zile nu s-au constatat modificări în comportamentul animalelor și nici decesul lor.

Administrarea substanțelor cercetate, intragastral și intraperitoneal, în doze de 1000, 2000, 4000, 6000 mg/kg s-a caracterizat printr-o perioadă de hipodinamie și reducere a reacției la stimulii exogeni. Toate animalele au revenit la starea inițială pe parcursul primelor 2 ore (pentru 1000 mg/kg, 2000 mg/kg) și 4-5 ore (pentru 4000 mg/kg, 6000 mg/kg). La animalele din loturile care au primit doza de 6000 mg/kg s-a observat, ocazional, inapetență pe parcursul primelor 24 de ore. La o femelă și un mascul, care au primit extract din *Agrimoniae herba* în doza de 6000 mg/kg intraperitoneal, s-a menționat o diminuare a activității motorii, cu reacție redusă, apoi din ce în ce mai slabă la stimulii exogeni, cu dezvoltarea unei stări terminale (*gaspings*) și decesul animalelor în decurs de 48 de ore a femelei și 96 de ore a masculului. Convulsii nu s-au remarcat. Din cauza imposibilității determinării LD100%, nu s-a putut stabili LD50% după metoda Kerber.

La toate celelalte doze administrate intragastral și intraperitoneal, nu s-a constatat decesul animalelor. La necropsie, la examinarea organelor interne precum: limba, mucoasele cavității bucale, dinții, traheea, esofagul, plămânii, inima, ficatul, rinichii, splina, aorta, vezica urinară în loturile experimentale și cele de control, la ambele metode de administrare, modificări patologice vizibile nu au fost stabilite.

range of 5-25 µg/ml, and by correlation calculation was determined Inhibitory Concentration (IC) 50 value. As a result of evaluating the scavenger capacity extracts of *Agrimoniae herba*, *Cichorii herba*, by DPPH free radical method was determined a good antioxidant capacity with activity of over 50% inhibition. Antioxidant activity by the DPPH test indicates that the lower of IC50, mentioning the higher antioxidant action: *Agrimoniae herba* (IC50 = 45.557 µg/ml) *Cichorii herba* (IC50 = 173.08 µg/ml), which determined us to continue the studies on the products by determining the acute toxicity.

The result of the acute toxicity study, determined by the fixed dose method with acute toxic class setting according to TG 423 (*Acute Toxic Class Method*), indicates that there were no changes in the behavior and spontaneous motor activity of animals in the control and study groups. The animals were in active movement, they used food and water. The condition of the mucous membranes and the skin cover is recorded without pathological changes. The coat of the animals was neat, glossy, free of alopecia outbreaks, light yellow urine, retained teeth, and the visible mucus was pale, glossy, smooth. The mammary glands of the females on palpation without induration and without elimination. Male genital organs were expressed normally. Deformations or edema of the extremities were not noted. Monitoring during the experimental process of the feeding process did not reveal any changes between the investigated and the control groups. There were no significant differences in the body weight dynamics between animals in the investigated and control group. Somewhat greater weight gain was seen in control animals than in experimental groups. Exploration did not have a statistically significant character, but a trend. Upon administration of the reference substance and dose of 200 mg/kg, enteral and intraperitoneal, and 7-day surveillance, there were not observed changes in the behavior of the animals or their death.

The administration of the investigated, intragastric and intraperitoneal substances at doses of 1000, 2000, 4000, 6000 mg/kg was characterized by a period of hypodynamia and reduction of the response to exogenous stimulants. All animals returned to initial condition during the first 2 hours (for 1000 mg/kg, 2000 mg/kg) and 4-5 hours (for 4000 mg/kg, 6000 mg/kg). At the animals from the 6000 mg/kg doses, occasional was observed loss appetite during the first 24 hours. For a female and a male who received extract of *Agrimoniae herba* dose of 6000 mg/kg intraperitoneally, there was observed a decrease in motor activity, with reduced response, then weaker to exogenous stimuli, with the development of a gasping and the death of the animals within 48 hours of the female and 96 hours of the male. The convulsions were not noticeable. Due to the impossibility of LD100% determination, LD50% could not be established using the Kerber method.

At all other doses administered in the intragastric and intraperitoneal ways, did not cause the death of the animals. In necropsy, examining internal organs such as the tongue, mucous membranes of the mouth, teeth, trachea, esophagus, lungs, heart, liver, kidney, spleen, aorta, urinary bladder in the experimental and control groups, there have not been established pathologically visible changes.

Rezultatele obținute ne-au permis să stabilim că la doza maximă administrată în cadrul experimentului, care a corespuns cu 6000 mg/kg pentru extractele obținute din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba*, la administrarea enterală pentru *Cichorii herba* nu s-a constatat doza letală – LD = 0%. Procentajul maxim de letalitate pentru extractul din *Agrimoniae herba* la administrarea intraperitoneală (i/p) a fost stabilit la doza maximă administrată de 6000 mg/kg. Astfel, matematic, prin metoda proporțiilor, s-a calculat DL25% = 4412 mg/kg pentru extractul de *Agrimoniae herba* la administrare i/p. Pentru *Cichorii herba*, nu a fost posibil de calculat indicii respectivi, din cauza lipsei mortalității.

DL50% pentru extractele din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba*, estimată conform metodei TG 423 (*Acute Toxic Class Method*) este >5000 mg/kg, ce caracterizează extractele studiate ca fiind, practic, inofensive. Rezultatele detaliate ale investigațiilor sunt prezentate în Tabelele 1-6.

The results obtained allowed us to establish that at the maximum dose administered in the experiment which corresponded to 6000 mg/kg for extracts obtained of *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba*, on enteral administration for *Cichorii herba* did not find the lethal dose – LD = 0%. The maximum lethality rate for extract of *Agrimoniae herba* on intraperitoneal administration was established at the maximum dose of 6000 mg/kg. Thus, mathematically, by the properties method, was calculated DL25% = 4412 mg/kg for extract of *Agrimoniae herba*, intraperitoneal administration. For *Cichorii herba*, it was not possible to establish those indices, due to lack of mortality.

DL50% for extracts of *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba*, estimated according to the TG 423 (*Acute Toxic Class Method*), is >5000 mg/kg, which characterizes the studied extracts as practically harmless. The detailed results of the investigations are presented in Tables 1-6.

Tabelul 1. Rezultatele toxicității acute – administrare intragastrală (*Extractum Agrimoniae herba*).

Table 1. The results of acute toxicity – enteral administration (*Extractum Agrimoniae herba*).

Doze / Doses	masculi / males		femele / females		total decese / total death	
	n	deces / death	n	deces / death	n	deces / death
200 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
1000 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
2000 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
4000 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
6000 mg/kg	3	0	3	0	6	0%

Tabelul 2. Rezultatele toxicității acute – administrare intraperitoneală (*Extractum Agrimoniae herba*).

Table 2. The results of acute toxicity – intraperitoneal administration (*Extractum Agrimoniae herba*).

Doze / Doses	masculi / males		femele / females		total decese / total death	
	n	deces / death	n	deces / death	n	deces / death
200 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
1000 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
2000 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
4000 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
6000 mg/kg	3	1	3	1	6	34%

Tabelul 3. Rezultatele toxicității acute – administrare intragastrală (*Extractum Cichorii herba*).

Table 3. The results of acute toxicity – enteral administration (*Extractum Cichorii herba*).

Doze / Doses	masculi / males		femele / females		total decese / total death	
	n	deces / death	n	deces / death	n	deces / death
200 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
1000 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
2000 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
4000 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
6000 mg/kg	3	0	3	0	6	0%

Tabelul 4. Rezultatele toxicității acute – administrare intraperitoneală (*Extractum Cichorii herba*).
Table 4. The results of acute toxicity – intraperitoneal administration (*Extractum Cichorii herba*).

Doze / Doses	masculi / males		femele / females		total decese / total death	
	n	deces / death	n	deces / death	n	deces / death
200 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
1000 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
2000 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
4000 mg/kg	3	0	3	0	6	0%
6000 mg/kg	3	0	3	0	6	0%

Tabelul 5. Grupurile de control – administrare intragastrală (*sol. NaCl 0,9%*).
Table 5. Control groups – enteral administration (*sol. NaCl 0,9%*).

Doze / Doses	masculi / males		femele / females		total decese / total death	
	n	deces / death	n	deces / death	n	deces / death
sol. NaCl 0,9%	3	0	3	0	6	0%

Tabelul 6. Grupurile de control – administrare intraperitoneală (*sol. NaCl 0,9%*).
Table 6. Control groups – intraperitoneal administration (*sol. NaCl 0,9%*).

Doze / Doses	masculi / males		femele / females		total decese / total death	
	n	deces / death	n	deces / death	n	deces / death
sol. NaCl 0,9%	3	0	3	0	6	0%

Tabelul 7. Determinarea clasei de toxicitate pentru extractele de *Cichorii herba* și *Agrimoniae herba*, conform TG 423: *Acute Toxic Class Method (OECD)*.

Table 7. Determination of the toxicity class for extractum from *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba*, on the bases of TG 423: *Acute Toxic Class Method (OECD)*.

Denumirea extractului <i>Name of the extract</i>	Clasa de toxicitate <i>The toxicity class</i>	DL50 estimat, mg/kg <i>Estimated DL50, mg/kg</i>
Extractum <i>Agrimoniae herba</i>	5 (practic inofensivă) 5 (practically inoffensive)	>5000
Extractum <i>Cichorii herba</i>	5 (practic inofensivă) 5 (practically inoffensive)	>5000

Discuții

Studiul fitochimic și biologic al plantelor medicinale din colecția Centrului Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale USMF „Nicolae Testemițanu” rămâne una din direcțiile prioritare de cercetare. Antioxidanții sunt substanțe chimice care neutralizează efectele radicalilor liberi și protejează organismul uman, formând bariere succesive de protecție, în funcție de tipul de acțiune asupra radicalilor. Studiile științifice confirmă că antioxidanții pot proteja celulele umane, ajutând la distrugerea microorganismelor cu care corpul intră în contact. Totodată, antioxidanții sunt studiați pe larg și recunoscuți și pentru faptul că încetinesc procesul de îmbătrânire. O parte dintre antioxidanți sunt identificați în cantități suficiente în

Discussion

The phytochemical and biological study of medicinal plants from the collection of Scientific Center of Medicinal Plants Cultivation of *Nicolae Testemițanu* SUMPh remains one of the priority research directions. Interest in natural antioxidants, especially those which comes from the medicinal plants, has been increased in recent years, including through multiple publications. Antioxidants are chemical substances that neutralize the effects of free radicals and protect the human body, forming successive barriers to protection, depending on the type of action on the radicals. Scientific studies confirm that antioxidants can protect human cells, helping to destroy the microorganisms with which the body comes into contact. At

plante medicinale bogate în polifenoli, flavonoide, taninuri, vitamine. În studiul nostru se prezintă cercetări chimice și biologice ale extractelor obținute din *Argimoniae herba*, *Cichorii herba*, cu proprietăți antioxidante remarcabile, produse vegetale din colecția Centrului Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale USMF „Nicolae Testemițanu”.

Metoda determinării toxicității acute a extractelor obținute din *Argimoniae herba*, *Cichorii herba*, corespunde metodei dozelor fixe cu stabilirea clasei toxice, prin administrare intragastrală și intraperitoneală, conform TG 423 (*Acute Toxic Class Method*). De menționat că, în realizarea studiului s-au preparat concentrații în doze de 200 mg/kg, 1000 mg/kg, 2000 mg/kg, 4000 mg/kg și doza maximă 6000 mg/kg.

Conform datelor acestui studiu, se constată o toxicitate redusă atât la administrarea enterală, cât și administrarea intraperitoneală, ce caracterizează extractele obținute din părți aeriene de turiță (*Agrimoniae herba*) și părți aeriene de cicoare (*Cichorii herba*) ca fiind, practic, inofensive, cu clasa de toxicitate 5. Rezultatele obținute pot servi ca o premiză pentru continuarea studiilor preclinice și clinice de determinare a inofensivității și eficacității pentru produsele menționate, în scopul obținerii de fitopreparate noi în Republica Moldova.

Concluzii

- 1) Părțile aeriene de turiță și cicoare manifestă remarcabile proprietăți antioxidante: *Agrimoniae herba* (IC50 = 45,557 μg/ml), *Cichorii herba* (IC50 = 173,08 μg/ml), cu o corelare în conținutul total de polifenoli, pentru turiță de 6,07% și, respectiv, cicoare – de 2,88%.
- 2) Doza maximă administrată în cadrul experimentului, care a corespuns cu 6000 mg/kg pentru extractele obținute din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* la administrarea enterală și cea intraperitoneală, pentru *Cichorii herba* nu s-a constatat o doză letală (DL = 0%).
- 3) Studiul denotă o toxicitate acută redusă atât la administrarea enterală, cât și la administrarea intraperitoneală, raportată la clasa de toxicitate 5, fapt ce poate servi drept premiză pentru continuarea studiilor pentru extractele obținute din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba*, produse ce pot constitui o sursă valoroasă de materie primă în obținerea de noi fitopreparate.

Declarația de conflict de interes

Nimic de declarat.

Contribuția autorilor

Autorii au contribuit în mod egal la elaborarea și scrierea manuscrisului. Toți autorii au citit și aprobat versiunea finală a articolului.

the same time, antioxidants are widely studied and recognized for slowing the aging process. Some antioxidants are identified in sufficient quantities in medicinal plants which are rich in polyphenols, flavonoids, tannins, vitamins. The studies present chemical and biological research of vegetable products: *Argimoniae herba*, *Cichoare herba*, with remarkable antioxidant properties, produced from the Scientific Center of Medicinal Plants Cultivation of *Nicolae Testemitanu* SUMPh.

Method of determining the acute toxicity of extracts obtained from *Argimoniae herba*, *Cichoare herba* corresponds to the fixed dose method with toxic class setting by enteral and intraperitoneal administration, according to TG 423 (*Acute Toxic Class Method*). It should be noted that concentrations were achieved in the study at doses of: 200 mg/kg, 1000 mg/kg, 2000 mg/kg, 4000 mg/kg and maximum dose 6000 mg/kg. Larger doses have not been used, taking into account both the requirements of international requirements and the impossibility of increasing the volume of liquid.

According to the data of this study, reduced toxicity is observed for both enteral administration and intraperitoneal administration which characterizes the extracts obtained from *Argimoniae herba*, *Cichorsherba*, as being practically harmless, with toxicity class 5, and the results can serve as a prerequisite for continuing preclinical and clinical studies to determine the harmlessness and efficacy of these products, in order to obtain new phytopreparations in the Republic of Moldova.

Conclusions

- 1) Aerial parts of agrimony and chicory exhibit remarkable antioxidant properties: *Agrimoniae herba* (IC50 = 45.557 μg/ml), *Cichorii herba* (IC50 = 173.08 μg/ml) with a correlation in total polyphenols, for agrimony – 6.07% and respectively chicory – 2.88%.
- 2) The results obtained allowed us to establish that the maximum dose administered in the experiment which corresponded to 6000 mg/kg for extracts obtained from *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba* at enteral and intraperitoneal administration, for *Cichorii herba* did not confirm the lethal dose – DL = 0%.
- 3) The study indicate the reduced acute toxicity both at the enteral and as well intraperitoneal administration, with toxicity class 5, which may serve as a prerequisite for continued studies on extracts obtained from *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba*, products which can constitute a valuable source of material in the production of new phytopreparations.

Declaration of conflicting interests

The author declares lack of interest conflict.

Author's contribution

All authors equally contributed to elaboration and writing of the manuscript. All authors read and accepted the final version of the manuscript.

Referințe / references

1. Amarowicz R., Pegg B., Barl B. *et al.* Antioxidant activity of extracts of phenolic compounds from selected plant species. *Biologically Active Phytochemicals in Food*, 2003; 16: 124-128.
2. Renee A. *Cichorium intybus*: traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Complementary and Alternative Medicine*, 2013; (15): 579-95.
3. Ionescu D., Popescu M., Rizea G. *et al.* Polyphenols and minerals, antioxidants in the plants used in the natural treatment of hepatobiliary disorders. *Rev. Chim. Bucharest*, 2014; 65 (5): 507-510.
4. Mirjana Z., Muruzovi C. *et al.* Extracts of *Agrimonia eupatoria L.* as sources of biologically active compounds and evaluation of their antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm activities. *Journal of food and drug analysis*, 2016; 24: 539-547.
5. Oniga I., Hanganu D., Benedec D., Toiu A. Analiza produselor naturale medicinale, ed. III-a. Editura Medicală Universitară Iuliu Hațieganu. Cluj-Napoca, România, 2014: 138-139.
6. Vlase L., Mocan A., Hanganu D., Benedec D., Gheldiu A, Crisan G. Comparative study of polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of four *Galium sp.* *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2014; 9 (3): 1085-1094.
7. Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. Food Science and Technology*, 1995 (28): 25-30.
8. Handbook for Good Laboratory Practice (GLP). *Quality practices for regulated non-clinical research and development*. World Health Organization, 2009: 328 p.
9. Legea RM nr. 265 din 28.07.2006 „Privind protecția animalelor folosite în scopuri experimentale sau în alte scopuri științifice”. *Monitorul Oficial*, nr. 168-169. Chisinau, 27.10.2006.
10. OECD Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity. *Acute Toxic Class Method*. 17th December 2001.
11. Хабриев Р.У. и соавт. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. Москва, 2005: 827 с.
12. Каркищенко Н., Грачева С. и соавт. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. Москва, 2010: 358 с.