

**STUDIUL ACȚIUNII ANTIOXIDANTE A UNOR PLANTE MEDICINALE
DIN COLECȚIA CȘCPM USMF „NICOLAE TESTEMIȚANU”
PRIN UTILIZAREA TESTULUI DPPH**

**Maria Cojocaru-Toma¹ – dr. în șt. farm., conf. univ., Anatolie Nistreanu¹ – dr. în șt. farm.,
prof. univ., Nicolae Ciobanu¹ – dr. în șt. farm., conf. univ., Gianina Crișan² – dr. în șt. farm.,
prof. univ., Ilioara Oniga² – dr. în șt. farm., prof. univ., Daniela Benedec² – dr. în șt. farm.,
conf. univ., Daniela Hanganu² – dr. în șt. farm., conf. univ., Mircea Tămaș² – dr. în șt. biol.
prof. univ., Ion Ungureanu³ – dr. în șt. biol., conf. univ.,**

¹Facultatea de Farmacie, IP USMF „Nicolae Testemițanu”,

**²Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie,
„Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, România,**

³Centrul Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale, IP USMF „Nicolae Testemițanu”

e-mail: maria.cojocaru@usmf.md, tel. 373 069283288

Rezumat.

Interesul în antioxidanți naturali, în special, cei proveniți din plante medicinale, a crescut în ultimii ani, inclusiv prin multiple studii și publicații. Scopul acestei lucrări constă în confirmarea acțiunii antioxidante, cu utilizarea metodei spectrofotometrice prin testul 1,1,-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), pentru unele produse vegetale: *Argimoniae herba*, *Cichorii*

herba, Potentillae herba, Symphyti radix, colectate din colecția Centrului Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale USMF „Nicolae Testemițanu”. Rezultatele experimentale obținute denotă că părțile aeriene de turiță manifestă cea mai înaltă activitate antioxidantă, urmată de sclipeti, cicoare și tătăneasă: *Agrimonia eupatoria* L. (IC 50 = 45.557 μg/ml) > *Potentilla erecta* L. Rausch. (60.647 μg/ml) > *Cichorium intybus* L. (IC 50 = 173.08 μg/ml) > *Symphytum officinale* L. (205,56 μg/ml).

Cuvinte-cheie: plante medicinale, produse vegetale, acțiune antioxidantă, testul DPPH

Summary: Study of antioxidant action of medicinal plants of the collection SCCMP SUMPh „Nicolae Testemițanu” using the DPPH test

The increasing interest in natural antioxidants particularly those extracted from medicinal plants has grown in the last few years due to several studies and publications. The aim of this research is the confirmation of antioxidant action, released through spectrophotometry (test 1,1,-2-picrylhydrazyl (DPPH) for some herbal products: *Agrimoniae herba, Cichorii herba, Potentillae herba, Symphyti radix*. The products are gathered from Scientific Cultivation Center of Medicinal Plants SUMPh „Nicolae Testemițanu”. The obtained experimental data show that agrimony manifests the highest antioxidant activity followed by potentilla, chicory and comfrey: *Agrimonia eupatoria* L. (IC 50 = 45.557 μg/ml) > *Potentilla erecta* L. Rausch. (60.647 μg/ml) > *Cichorium intybus* L. (IC 50 = 173.08 μg/ml) > *Symphytum officinale* L. (205,56 μg/ml).

Key words: medicinal plants, herbal products, antioxidant action, DPPH test

Резюме: Изучение антиоксидантного действия лекарственных растений из коллекции НЦКЛР ГУМФ «Николае Тестемицану» с помощью теста DPPH

Растущий интерес природных антиоксидантов, особенно получаемых из лекарственных растений, увеличился в последние годы, в том числе в многочисленных исследованиях и публикациях. Цель данной работы является подтверждение антиоксидантного действия, при использовании спектрофотометрического метода через теста 1-дифенил-2-пикрилгидразил (DPPH) для некоторых лекарственных видов сырья: *Agrimoniae herba, Cichorii herba, Potentillae herba, Symphyti radix*, собранных с коллекции Научного Центра Культивирования Лекарственных Растений ГУМФ „Николае Тестемицану”. Полученные экспериментальные данные показывают что надземные части репешка имеют самую высокую антиоксидантную активность, за которым следует лапчатка, цикорий и окопник: *Agrimonia eupatoria* L. (IC 50 = 45.557 μg/ml) > *Potentilla erecta* L. Rausch. (60.647 μg/ml) > *Cichorium intybus* L. (IC 50 = 173.08 μg/ml) > *Symphytum officinale* L. (205,56 μg/ml).

Ключевые слова: лекарственные растения, лекарственное растительное сырье, антиоксидантное действие, тест DPPH

Introducere. Una din tendințele actuale de dezvoltare a industriei farmaceutice este obținerea și utilizarea antioxidantilor extrași din plante medicinale, cu conținut de diverse principii active, cum ar fi: polifenolii, substanțele tanante, flavonoidele, vitaminele. Procesele de oxidare pot produce radicali liberi, care în concentrații fiziologice sunt indispensabili funcționării normale a celulelor, dar în exces, pot afecta structura și activitatea normală a celulelor. La rândul lui, organismul uman produce substanțe antioxidante, cu capacitate de a le neutraliza, acționând ca agenți reducători, împotriva radicalilor liberi.

Material și metode. În calitate de sursă de antioxidanți naturali au fost cercetate plante medicinale din Centrul Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. Plantele medicinale au fost evaluate în baza studiilor și publicațiilor științifice din domeniu, după indicii sistematici, clasa de principii active, cât și caracterizarea principiilor active responsabile de acțiunea antioxidantă. Activitatea antioxidantă în produsele vegetale s-a efectuat prin metoda spectrofotometrică, cu testul 1,1,-difenil-2-picrilhi-

drazil (DPPH), metodă bazată pe diminuarea absorbției radicalului în prezența antioxidantilor DPPH [2,10].

Rezultate și discuții. Antioxidanții reprezintă molecula care în comparație cu materialul oxidabil este prezent într-o concentrație scăzută, ce încetinește sau oprește complet oxidarea acestuia. După structura lor chimică, sunt compuși macromoleculari: fermenți: superoxid dismutaza, catalaza; unele proteine capabile să fixeze ionii unor metale, sau compuși cu masa moleculară joasă, cu un mecanism principal de apărare al organismului împotriva oxidării. Antioxidanții acționează prin cedarea și completarea ultimului strat electronic al radicalului liber, care nefiind deficitar în electroni, își pierde capacitatea nocivă de acțiune. Ei formează bariere succesive de protecție, în dependență de tipul de acțiune asupra radicalilor, care micșorează intensitatea oxidării radicalice. Este de dorit ca nivelul și acțiunea radicalilor liberi să fie sub capacitatea de acțiune a antioxidantilor. Atunci când acțiunea radicalilor liberi o depășește pe cea a antioxidantilor, în caz de stres oxidativ, au loc fenomene de uzură și îmbătrânire celulară precoce, feno-

mene ce pot produce modificări structurale soldate cu destabilizarea morfologiei celulelor și instalarea unor afecțiuni degenerative. Rezistența efectului antioxidanților poate fi caracterizat prin timpul de inducție, cu cât este mai eficient antioxidantul, cu atât este mai lungă perioada de inducție și cu atât mai târziu apare oxidarea moleculei [5, 8].

Este cunoscut faptul, că multe plante medicinale se caracterizează prin valoare biologică sporită, datorită conținutului de antioxidanți, printre care putem menționa unele produse vegetale bogate în polifenoli: flavonoide, substanțe tanante și vitamine, din colecția CȘCPM a USMF „Nicolae Testemițanu”.

Cicoare - *Cichorium intybus L.*; *Cichorii herba et radix*; fam. Asteraceae. Remarcăm, că florile și rădăcinile plantei conțin cicorină, arginină, acid cicoric și principii amare. Pe lângă inulină, rădăcina conține și zaharuri, substanțe tanante, uleiuri volatile, pectine, rășine. Întreaga plantă conține un latex, al cărui constituenț major este inulina. Planta servește și ca sursă de vitamine: A, C, E, K, P, PP. Flavonoidele constituie cca 3%: luteol, cvercitol, riboflavină. În părți aeriene domină: cicorina, insulina, arginina, colina, se întâlnesc de asemenea și microelemente: Fe, P, Ca. În rădăcini predomină substanțele triterpenice amare, fructoza, taninuri și uleiul volatil. În rădăcina proaspătă conținutul de inulină constituie cca 11% -23%.

Cicoarea este o plantă recunoscută pentru efectele sale curative, încă din antichitate. Principiile active stimulează digestia, detoxifică organismul, scade colesterolul și glicemia. Acțiunea anorexigenă a preparatelor obținute din rădăcini de cicoare este superioară extractelor obținute din părțile aeriene ale plantei. Prin faptul că sunt anorexigene și laxative, rădăcinile de cicoare, sub formă de decoct sunt indicate în obezitate. Preparatele din cicoare se recomandă în cazul afecțiunilor digestive: gastrite, hepatite, colesictite, spasme hepatobiliare, 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 [5, 11].

Sclipeți - *Potentilla erecta L. Rausch.*; *Potentillae herba et radix*; fam. Rosaceae. Rizomii și rădăcinile de sclipeți conțin polifenoli: taninuri condensate 30%, acid galic, flavonoide (camferol), heterozida tormentilina, flabafene, saponozide triterpenice, mucilagii și substanțe minerale. În părțile aeriene au fost identificate vitamina C și K.

Sclipeții manifestă proprietăți astringente, antiinflamatoare, hemostatice, antimicrobiene și cicatrizante, prin conținutul de taninuri. În Moldova s-a confirmat acțiunea hepatoprotectoare a decoctului din sclipeți

peți în hepatite cornice, ciroze hepatice complicate cu ascite. Deasemenea, specia se folosește împotriva ulcerelor varicoase, eczemelor, diareiei, enterocolitelor și în combustii. Este un antibiotic natural, contribuind la eliminarea microbilor și diminuarea proceselor inflamatorii. Poate fi administrată sub formă de decoct, infuzie, unguent [6, 9, 11].

Tătăneasă - *Symphytum officinale L.*; *Symphyti radix*; fam. Boraginaceae. În rădăcini de tătăneasă au fost identificați alcaloizi pirolizidinici (simfitină, simfitocinoglosină), flavonoide, vitamine A, C, ulei volatil, mucilagii, taninuri, heterozide și săruri minerale: Ca, K. Produsul vegetal este valoros prin conținutul de alantoină.

Planta este cunoscută din antichitate, utilizată de Dioscorides prin proprietățile sale regeneratoare. Manifestă proprietăți hepatoprotectoare, antitumorale, cicatrizante, antiinflamatoare, imunomodulatoare. Multe preparate de uz extern produse în ultimul deceniu sunt pe baza de tătăneasă. În Republica Moldova a fost confirmată acțiunea hepatoprotectoare atât a extractului dens din rădăcini de tătăneasă, cât și a alantoinii, principiului activ, în hepatită acută și cronică, indusă cu tetraclorură de carbon, la animale de laborator [4, 6, 11].

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

Turița este cunoscută de pe vremea vechilor egipteni, posedă efect puternic curativ în boli hepatice, gastrointestinale, afecțiuni ale căilor biliare, prin conținutul de taninuri și flavonoide. Menționăm că turița este un bun regenerat, administrată sub formă de infuzie și decoct. Poate fi utilizată în patologii hepatice și în combinație cu alte plante medicinale, cum ar fi drăgaica și vinarița [1,9,11].

Produsele vegetale pentru plantele menționate au fost recoltate din colecția CȘCPM USMF „Nicolae Testemițanu”, în dependență de natura produsului vegetal și recomandările din farmacopee. Părțile aeriene: *Cichorii herba*, *Potentillae herba* și *Agrimoniae eupatoriae herba* s-au recoltat de la începutul înfloririi, pe întreaga perioadă de înflorire. Părțile subterane: *Symphyti radix*, s-au recoltat toamna târziu. Rădăcinile săpate, spălate rapid în jet de apă, tăiate în bucăți mici și uscate la temperatura de până la 40°C, sau păstrate în ambalaje de hârtie, cu inscripționările respective.

Acțiunea antioxidantă a plantelor medicinale este bazată pe reducerea ionului feric sau cupric, neutralizarea radicalului de oxigen, a peroxidului de hidrogen sau a radicalului liber 1,1,-difetil-2-picrilhidrazil

(DPPH). Metodă utilizată pentru cuantificarea antioxidanților în sisteme biologice complexe [1, 5].

Determinarea activității antioxidante prin metoda DPPH în produse vegetale.

1,1,-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) este o metodă spectrofotometrică, larg utilizată pentru a testa abilitatea compușilor de a îndepărta radicalii liberi sau capacitatea lor de a dona hidrogen. Metoda spectrometrică se bazează pe diminuarea absorbânței radicalului în prezența antioxidanților 1,1,-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), caracterizat ca un radical stabil, datorită delocalizării electronului neîmperechiat, ce determină apariția culorii violet și formarea unei benzi de absorbție cu maximum la 517 nm. Astfel, reactivul DPPH este utilizat ca sursă radicalică în evaluarea activității antioxidante, redus de la violet la o culoare galben pal, în prezența antioxidantului [1, 3, 7, 10].

Metoda de lucru. Diferite cantități de extracte etanolice (10%) din produsele vegetale: *Argimoniae herba*, *Cichorii herba*, *Potentillae herba*, *Symphyti radix*, diluate de 500 de ori: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 ml au fost aduse la 4.0 ml cu metanol, la care se adaugă 4 ml soluție DPPH, cu concentrația (0.1 gL^{-1}) dizolvat în metanol. După 30 minute de incubare la 40°C în baia de apă, a fost înregistrată absorbânța la lungimea de undă 517 nm. Soluția metanolică de Trolox ($0,25 \text{ g/L}$) a fost folosită ca antioxidant de referință, în intervalul de concentrații de 5-25 $\mu\text{g/ml}$ pentru Trolox. În continuare au fost diluate cu metanol până la un volum de 4 ml și apoi tratate cu

reactiv DPPH (4 ml). Au fost determinate absorbânțele în aceleași condiții ca pentru extractele vegetale, folosind ca martor, metanolul. IC_{50} pentru Trolox = 12 micrograme/ml. Toate spectrele de absorbție au fost înregistrate cu ajutorul unui spectrofotometru UV-VIS Jasco V530. Procentul de inhibiție, I%, s-a calculat, folosind formula:

$$I (\%) = [(A_{\text{control}} - A_{\text{probă}}) / (A_{\text{control}})] \times 100$$

în care
 A_{control} - absorbânța radicalului DPPH + etanol (soluția care conține toți reactivii, cu excepția probei);
 $A_{\text{probă}}$ - absorbânța radicalului DPPH + proba / referință.

Concentrația de inhibare efectivă a probelor necesară pentru neutralizarea radicalului DPPH cu 50% - IC_{50} a fost obținută prin intermediul regresiei liniare. Au fost calculate valorile IC_{50} pentru toate probele de analizat și pentru soluțiile standard. Abscisa reprezintă cantitatea de produs vegetal ($\mu\text{g/ml}$) sau substanță standard, iar ordonata procentul de inhibiție I%, cu construirea curbelor cinetice ale interacțiunii extractelor cercetate, utilizând soluția radicalului liber DPPH și calculând procentul de inhibiție. Activitatea antioxidantă în produse vegetale, cu testul DPPH, denotă faptul că cu cât IC_{50} este mai mic, cu atât acțiunea antioxidantă este mai mare, explicat prin faptul că potențialele reducătoare ale inhibitorilor sunt invers proporționale cu puterea de donare a electronilor. Rezultatele obținute confirmă că părțile aeriene de turiță manifestă cea mai înaltă activitate antioxidantă, urmată de sclipeți, cicoare și tătăneasă. Datele se prezintă în figurile 1-5.

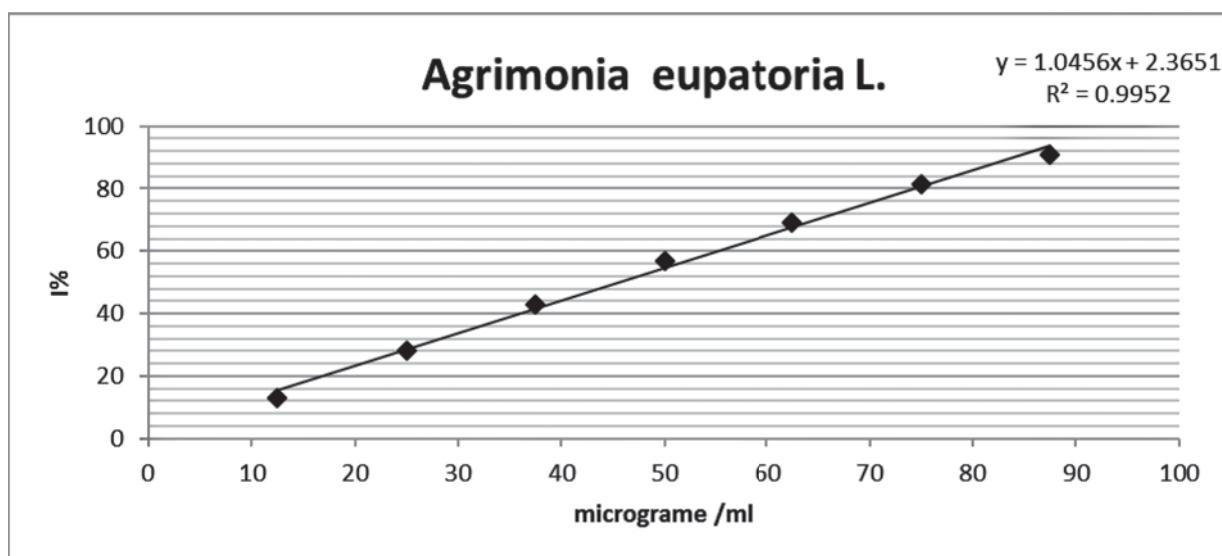


Figura 1. Acțiunea antioxidantă pentru *Agrimonia eupatoria L.*

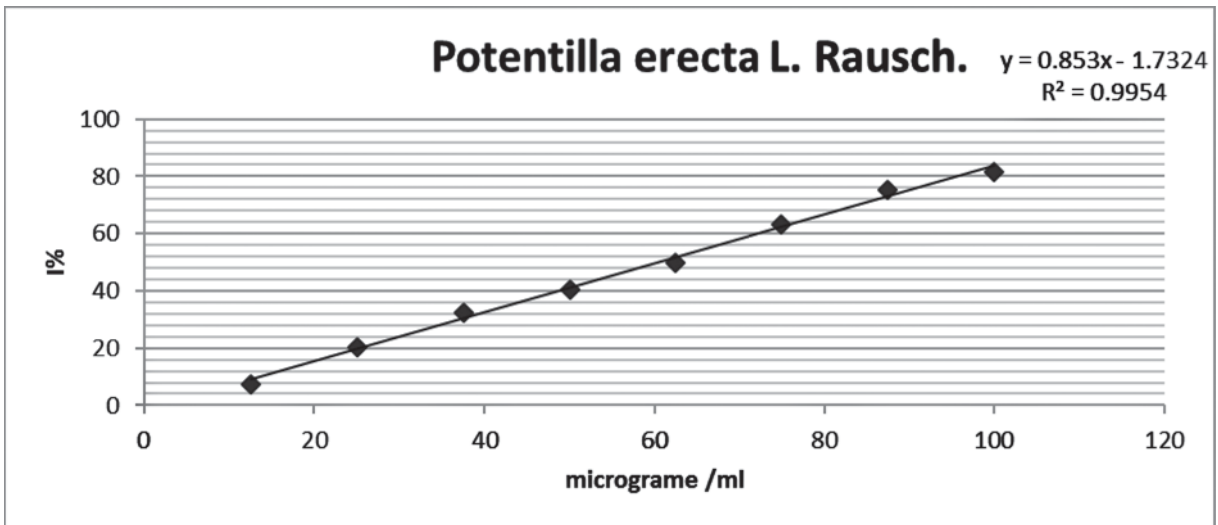


Figura 2. Acțiunea antioxidantă pentru *Potentilla erecta L.*

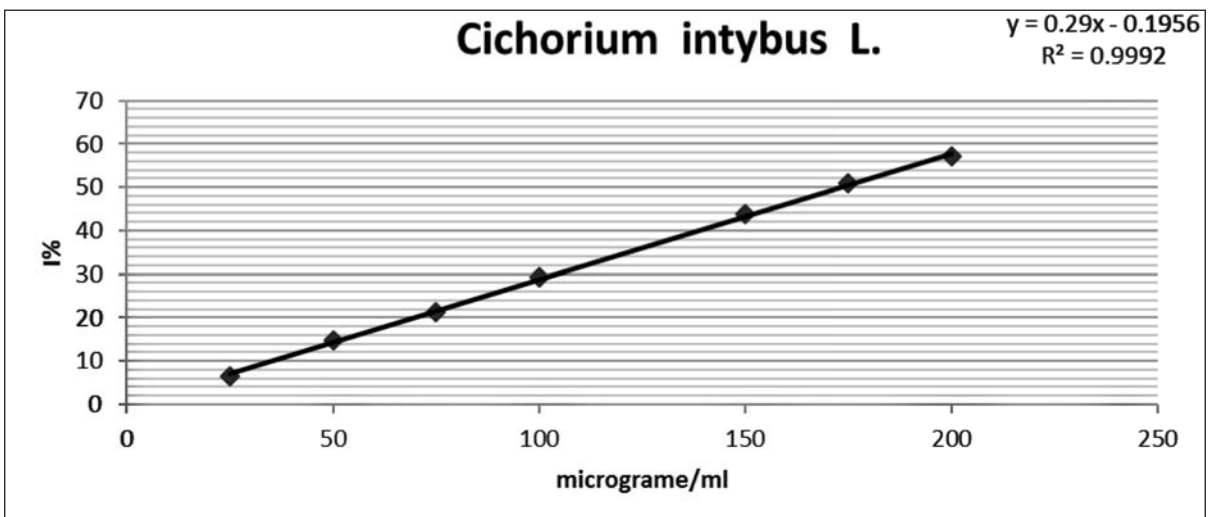


Figura 3. Acțiunea antioxidantă pentru *Cichorium intybus L.*

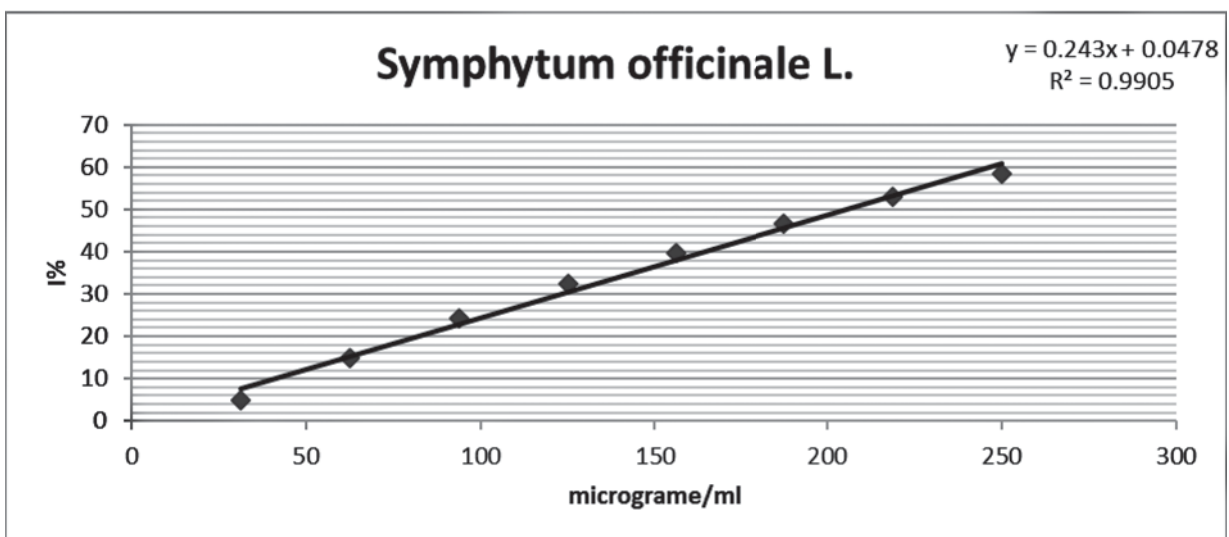


Figura 4. Acțiunea antioxidantă pentru *Symphytum officinale L.*

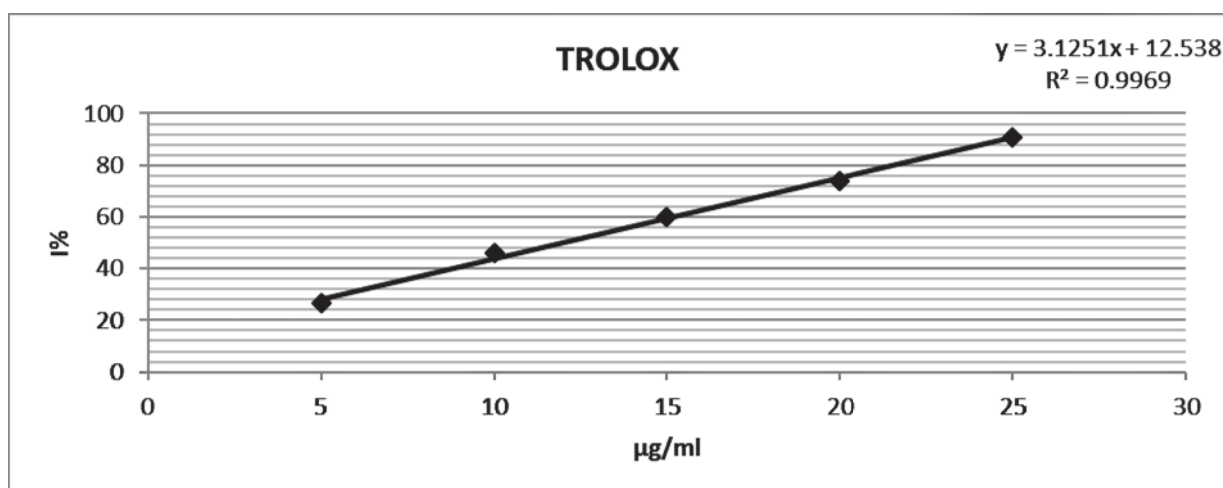


Figura 5. Acțiunea antioxidantă pentru Trolox

Concluzii:

1. Rezultatele studiului au pus în evidență acțiunea antioxidantă a unor plante medicinale din colecția Centrului Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale USMF „Nicolae Testemițanu”, în baza unui spectru larg de principii active: polifenoli, substanțe tanante, flavonoide și vitamine.

2. Acrivitatea antioxidantă în produse vegetale, confirmată experimental prin metoda spectrofotometrică cu testul DPPH, denotă faptul că cu cât IC 50 este mai mic, cu atât acțiunea antioxidantă este mai mare.

3. Rezultatele obținute confirmă că părțile aeriene de turiță manifestă cea mai înaltă activitate antioxidantă, urmată de sclipeți, cicoare și tătăneasă: *Agrimonia eupatoria* L. (IC 50 = 45.557 µg/ml) > *Potentilla erecta* L. Rausch (60.647 µg/ml) > *Cichorium intybus* L. (IC 50 = 173.08 µg/ml) > *Symphytum officinale* L. (205,56 µg/ml).

Mulțumiri! Acest studiu a fost realizat în perioada de stagiere la Facultatea de Farmacie a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, România.

Bibliografie

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, p. 124-128.
2. Arnao M., Canoa A., Alcolea A. *Estimation of free radical quenching activity of leaf pigment extracts*. *Phytochem Anal.*, 12, 2001, p.138-143.

3. 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, 28, 1995, p. 25-30.

4. Cojocaru-Toma M., Matcovschi C., Nistoreanu A. *Efectul hepatoprotector al alantoiniei, principiul activ al speciei *Symphytum officinale* L. Probleme actuale în medicina modernă în pragul mileniului nou*. Chișinău, 2000, p.191-192.

5. Miliauskas G., Venskutonis P., Vanbeek T. *Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts*. *Food Chem.*, 85, 2004. P. 231-237.

6. Nistoreanu A. *Farmacognozie*. Chișinău, Tipografia Centrală, 2000, p. 354-356; 576.

7. Oniga I., Hanganu D., Benedec D., Toiu A. *Analiza produselor naturale medicinale, ed. III-a*. Editura Medicală Universitară. Iuliu Hațieganu. Cluj-Napoca. 2014, p. 138-39.

8. Sies H. *Oxidative stress. Oxidants and antioxidants*, Ed. Academic Press, San Diego, 1992, p. 75-79.

9. Vennat B., Bos M., Pourrat A., Bastide P. et al. *Procyanidins from tormentil fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion*. *Biol Pharm Bull*, 1994, 21, p. 1613-1615.

10. 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*. Vol. 9, n3, 2014, p. 1085-1094.

11. William Ch. *Trease and Evans Pharmacognosy*. WB Saunders Company Ltd., London, Philadelphia, Toronto, Sydney, Tokyo, 1989, p. 403-404; 474; 477.