



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00489**

(22) Data de depozit: **05/07/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/09/2021** BOPI nr. **9/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2017 BOPI nr. **3/2017**

(73) Titular:

- **ANUCEANU ROBERT, STR. MOȚOC NR. 2, BL. P3, SC.3, AP. 72, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **ZBÂRCEA CRISTINA ELENA, STR. CALEA VĂCĂREȘTI NR. 308, BL. 1E, ET. 2, AP. 12, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **ȚÂRCOMNICU ISABELA, STR. TURDA NR. 127, BL. 2, SC. D, AP. 167, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **DINU MIHAELA, STR. ȘOIMĂREȘTIOR NR. 19, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **NEGREȘ SIMONA, ȘOS. GIURGIULUI NR. 121, BL. 5, SC. 2, AP. 44, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **HOVANEȚ MARILENA VIORICA, STR. CĂLINULUI NR. 13, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **ANGHEL ADRIANA IULIANA, STR. SOLD. N. SEBE NR. 5, BL. S24, AP. 36, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **NICOLESCU TEODOR OCTAVIAN, STR.PODUL GIURGIULUI NR.3, BL.11, SC.1, ET.5, AP.32, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **COJOCARU-TOMA MARIA, ȘOS. HANCEȘTI NR. 2, AP. 14, CHIȘINĂU, MD;**
- **CALALB TATIANA, STR. ALECU RUSSO NR. 55, AP. 146, CHIȘINĂU, MD**

(72) Inventatori:

- **ANUCEANU ROBERT, STR. MOȚOC NR. 2, BL. P3, SC.3, AP. 72, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **ZBÂRCEA CRISTINA ELENA, STR. CALEA VĂCĂREȘTI NR. 308, BL. 1E, ET. 2, AP. 12, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **ȚÂRCOMNICU ISABELA, STR. TURDA NR. 127, BL. 2, SC. D, AP. 167, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **DINU MIHAELA, STR. ȘOIMĂREȘTIOR NR. 19, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **NEGREȘ SIMONA, ȘOS. GIURGIULUI NR.121, BL.5, SC.2, AP.44, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **HOVANEȚ MARILENA VIORICA, STR. CĂLINULUI NR. 13, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **ANGHEL ADRIANA IULIANA, STR. SOLD. N. SEBE NR. 5, BL. S24, AP. 36, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **NICOLESCU TEODOR OCTAVIAN, STR.PODUL GIURGIULUI NR.3, BL.11, SC.1, ET.5, AP.32, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **COJOCARU-TOMA MARIA, ȘOS. HANCEȘTI NR. 2, AP. 14, CHIȘINĂU, MD;**
- **CALALB TATIANA, STR. ALECU RUSSO NR. 55, AP. 146, CHIȘINĂU, MD**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 2011/0229591 A1

(54) **EXTRACT DE ORIGINE VEGETALĂ PENTRU TRATAMENTUL DURERII NEUROPATE ASOCIATE CHIMIOTERAPIEI ȘI METODĂ DE OBȚINERE A ACESTUIA**



RO 131712 B1

1 Prezenta invenție se referă la un extract vegetal pentru abordarea terapeutică a
durerii neuropate asociate chimioterapiei și metode de utilizare a extractului pentru trata-
3 mentul durerii neuropate asociate chimioterapiei la om sau animale.

5 Durerea neuropată este o formă de durere unică prin intensitatea sa devastatoare,
prin simptomele eluzive, care scăpă descrierilor și prin inducerea unui sentiment de alienare
7 în mintea pacientului care trece de la un medic la altul în căutarea alinării [1]. Durerea
neuropată se deosebește de alte afecțiuni la care factorul cauzator al durerii este localizat
9 inițial în alte țesuturi non-neuronale (durere nociceptivă, de exemplu: cea din inflamațiile
articulare). Prin definiție, durerea neuropată își are originea într-o leziune a sistemului nervos
11 [2]. Această leziune modifică sensibilitatea sistemului nervos, în unele cazuri ireversibil,
scăzând pragul durerii până acolo încât stimuli inofensivi provoacă durere considerabilă, iar
13 durata și amplitudinea răspunsului la durere sunt amplificate, făcând ca această condiție
patologică să fie considerată din cauza acestor modificări o afecțiune distinctă a sistemului
nervos [3].

15 O formă de durere neuropată este cea indusă de unele tratamente oncologice larg
utilizate în diverse forme de cancer, în special paclitaxelul și derivații de platină. Sindromul
17 neuropatic indus de acestea afectează calitatea vieții pacienților respectivi și poate avea
drept consecință reducerea dozelor sau întreruperea prematură a tratamentului, cu con-
19 secințe asupra eficacității acestuia și a speranței de viață a pacienților [4]. În cazul pacien-
telor cu cancer de sân tratate cu taxani, de exemplu, numai 20-30% dintre acestea nu
21 dezvoltă neurotoxicitate, manifestată inclusiv prin durere neuropată [5].

23 Un grup de lucru al Federației Europene a Societăților de Neurologie (EFNS,
European Federation of Neurological Societies) afirma în anul 2006 că „tratamentul durerii
neuropate rămâne nesatisfăcător, în ciuda unei creșteri substanțiale a numărului studiilor
25 clinice” [6]. Analiza sistematică a studiilor clinice realizate cu intervenții farmacologice a
indicat că până în prezent majoritatea studiilor clinice randomizate pe eșantioane mari au
27 inclus pacienți cu polineuropatii diabetice și nevralgie post-herpetică; studii mai mici au
început să fie tot mai mult efectuate și în alte afecțiuni. În aceste studii, eficacitatea a fost
29 demonstrată (nivel A de dovadă) pentru antidepresivele triciclice, pregabalin și gabapentin,
tramadol și opioide (într-o varietate de afecțiuni), duloxetină, venlafaxină, lidocaină topică și
31 capsaicină topică (doar în unele afecțiuni). Dintre terapiile de combinație, dovezile sunt
favorabile asocierilor antidepresive triciclice-gabapentină și opioizi-gabapentină (nivel A de
33 dovadă). Aceste medicamente au demonstrat o eficacitate comparabilă în diferitele afecțiuni,
cu excepția nevralgiei de trigemen, a radiculopatiei cronice și a neuropatiei asociate HIV [7].
35 Deși farmacoterapia rămâne cea mai importantă opțiune de tratament, studiile transversale
arată că circa 75% dintre pacienții cu durere neuropată continuă să experimenteze durere
37 de intensitate moderată până la severă, în ciuda utilizării medicamentelor [8].

39 În plus, toate medicamentele utilizate în tratamentul durerii neuropate, deși
considerate sigure, au efecte adverse care nu pot fi neglijate. De exemplu, anumiți pacienți
nu pot atinge concentrații plasmatiche terapeutice cu gabapentin din cauza efectelor adverse:
41 somnolență (27,4%), amețeli (23,9%) sau ataxie (7,1%) [9]. În cazul carbamazepinei s-au
raportat efecte adverse la peste 50% dintre pacienți [10]. În cazul amitriptilinei circa 60% din
43 pacienți au raportat efecte adverse (față de 40% la placebo) [11]. În special la vârstnici,
efectele adverse intolerabile (mai probabile din cauza contextului fizio-patologic specific
45 vârstei și a polimedicatiei), perioadele lungi de creștere treptată a dozei pentru a atinge
rezultatul terapeutic dorit, dificultățile de administrare și satisfacția redusă cu rezultatele
47 tratamentului, conduc la înlocuirea unui medicament cu un altul sau adăugarea unui al doilea
medicament [12]. În special, dezvoltarea de medicamente lipsite de efecte adverse sedative
49 este anticipată ca o nevoie actuală ce urmează a fi satisfăcută [13].

RO 131712 B1

Abordările potențial utile explorate în ultimii ani în domeniul includ: AINS, corticosteroidi, blocanți ai canalelor ionice (de calciu, sodiu, potasiu, TRP), modulatori ai schimbului ionic (NCE și NHE), modulatori ai transportorilor ionici (NKCC-1, glicină), modulatori ai unei varietăți de receptori (serotonergici, dopaminergici, alfa- și beta-adrenergici, purinergici, histaminergici, ai kininei, ai endotelinei, ai melanocortinei, ai effinei, ORL1, ai aminoacizilor stimulatori - acidul glutamic, ai PAR), inhibitori enzimatici (ai metaloproteinazelor, ai unor proteaze, ai vasopeptidazei, ai D-aminoacid-oxidazei, ai amid-hidrolazei acizilor grași, ai aldozoreductazei și sorbitol-dehidrogenazei), medicamente care interferă cu căile de semnalizare imunologice (cascada complementului, citokine), neuropeptide și alți liganzi (AGE, RAGEs), factori de creștere ș.a. [14].

Există numeroase brevete care au ca obiect substanțe, extracte ori preparate destinate tratamentului durerii în general. Dintre acestea, mai multe brevete naționale și internaționale descriu diverse remedii vegetale propuse pentru tratamentul unei varietăți de simptome sau afecțiuni, printre care și pentru tratamentul durerii. Totuși, numărul celor care se referă la extracte vegetale pentru tratamentul durerii neuropate este foarte limitat. O interogare Espacenet utilizând cuvintele cheie „herbal AND neuropathic” a returnat un număr de 14 brevete/cereri de brevete, majoritatea din China, dintre care cinci se referă la aceeași invenție, ușor modificată/perfecționată), iar două nu se referă la durerea neuropată, ci la dermatita neuropată (a cărei componentă principală este pruritul și nu durerea).

P. Cao et al. (2015) au propus, pornind de la concepte specifice medicinei tradiționale chineze, o compoziție pentru tratamentul cancerului, despre care se pretinde, printre altele, că influențează favorabil și simptomele de durere neuropată induse de chimioterapie. Compoziția respectivă asociază mai multe produse vegetale: *Astragali membranaceus radix*, *Cinnamomi cortex*, *Paeonia alba radix*, *Jujubae fructus* și *Zingiberi rhizoma*, în anumite proporții preferate, extrase cu apă prin refluxare timp de 1-3 h. Extractul astfel obținut urmează a fi asociat cu unul sau mai mulți compuși chimioterapici [15]. O altă invenție referitoare la un remediu de medicină tradițională chineză abordează generic cefaleea, inclusiv de origine neuropată, și se bazează pe „*Ligusticum wallichii*, *Rhizoma Cimicifugae*, sămânță de piersică, șofrănel și *Ephedrae herbd*”, procesate în forme farmaceutice convenționale (comprimat, pulbere, capsulă, granule) [16]. S-a mai solicitat brevetarea unui spray inspirat de medicina tradițională chineză, spray destinat tratamentului spondilozei cervicale, despre care inventatorii au afirmat că „are unele efecte” și în durerea neuropată. Spray-ul include un amestec complex de produse vegetale (“*radix sophorae tonkinensis*, *ephedra chinezească*, rădăcină de bujor alb, resina draconis, tămâie, dangshen, rădăcină de kudzuvine, glicerina, *radix aconiti kusnezoffii praeparata*, rădăcină de *Angelica pubescens Maxim.f. biserrata*, pochivnic manciurian, rădăcină de ciematis chinezesc,” și unele substanțe pure de origine vegetală (mentol, borneol, azonă, glicerina etc), precum și etanol 95% [17]. Alte versiuni ale aceleiași invenții [18-21] cuprind liste ușor diferite ale ingredientelor de origine vegetală.

Invenția lui B. Xugang (2013) se focalizează tot asupra cefaleei neuropate și include un amestec complex de remedii vegetale chinezești: *Angelicae radix*, *Houttuynia cordata*, *Ligustri lucidi fructus*, *Sileris radiceis*, *Cinnamomum sp.* și *Liquiritiae radix*. Acestea sunt supuse unei decoctii la foc lent, concentrate până la o formă de pastă și apoi transformate în diverse forme farmaceutice [22]. Invenția lui B. Xie (2008) bazată pe un amestec complex de remedii tradiționale chineze este limitată la durerile cervicale și lombare de cauze neuropate [23].

1 M. Marchetti et al. (2015) au solicitat brevetarea unei compoziții pentru utilizare în
2 profilaxia și/sau tratamentul migrenei și/sau durerii neuropate, compoziție bazată pe o
3 lactonă sesquiterpenică (partenolida) din *Tanacetum parthenium* și o lactonă diterpenoidică
4 (andrografolida, neoandrografolida, deoxiandrografoiida sau amestecuri ale acestora) din
5 *Andrographis paniculata*. La acestea se adaugă riboflavină, magneziu, Co-Q10 sau
6 amestecuri ale acestora [24].

7 O soluție (în principal) nefarmaceutică, despre care s-a pretins că este utilă și în
8 durerea neuropată, este reprezentată de o pernă de masaj de fizioterapie la cald pentru
9 vertebrele cervicale [25], însă este puțin probabil ca aceasta să fie utilă în orice durere de
10 tip neuropat, indiferent de cauză și localizare anatomică.

11 *Withania somnifera* (L.) Dunal (Ashwagandha, cirește de iarnă, ginseng indian) este
12 o specie vegetală utilizată de secole în medicina ayurvedică din India și Nepal și în alte
13 sisteme de medicină tradițională (Unani, african) ca adaptogen [26], afrodisiac, tonic nervos,
14 antiinflamator, antitumoral [27-28] antifungic (în candidoze) [29], antidiabetic [30], aceste
15 utilizări fiind posibile chiar și în perioada sarcinii [31]. Extracte sau componente individuale
16 ale rădăcinii de *W. somnifera* au fost investigate cu rezultate pozitive în modele non-clinice
17 de epilepsie, boală Alzheimer [27, 32], Parkinson [27, 32, 33] și Huntington, stroke, inflamație
18 [72, 34, 35] și altele [36, 37, 38] rezultatele acestora indicând că produsul vegetal și
19 constituenții lui au potențiale proprietăți neuroprotectoare sau neuroregenerative la om [26,
20 27]. Tot date non-clinice au sugerat că produsele vegetale obținute de la această specie au
21 proprietăți imunomodulatoare și radioprotectoare [32, 39].

22 Un studiu *in vitro* a demonstrat că un extract metanolic de *Withania somnifera*, la
23 doze mici potențează răspunsul NMDA în neuronii piramidali CA1 din hipocamp, sugerând
24 un potențial efect glicin-mimetic [40]. Pe de altă parte, un extract apos din frunzele speciei,
25 a prezentat efecte protectoare față de efectele nocive induse de glutamat asupra neuronilor
26 [41], iar un extract metanolic de *Withania somnifera* a prezentat efecte GABA-mimetice într-
27 un model la șoareci juvenili [42]. Date ulterioare au sugerat că extractul metanolic de
28 *Withania* acționează la nivelul receptorilor sinaptici și extra-sinaptici GABAA, pe care îi
29 activează [32]. Un alt studiu a arătat că efectele extractului metanolic de *W. somnifera* pot
30 fi antagonizate de picrotoxină (antagonist GABA), dar nu de un antagonist NMDA, iar autorii
31 au speculat că extractul ar putea, din acest motiv, modula durerea oro-facială [43]. Nu există
32 date în literatura științifică de până în prezent care să afirme un rol al extractelor de *Withania*
33 *somnifera* în tratamentul durerii neuropate în general și al durerii neuropate induse de
34 chimioterapie în particular.

35 Problema tehnică a prezentei invenții este de a furniza un nou remediu natural pentru
36 tratamentul durerii neuropate induse de chimioterapie.

37 Soluția la această problemă tehnică constă într-un extract pentru tratamentul durerii
38 neuropate asociate chimioterapiei care se obține din rădăcina de *Withania somnifera* (L.)
39 *Dunal* prin extracție repetată cu solvenți, conține withaferină A, withanonă, withanolidă A,
40 withanolidă B, sominonă, deoxiwithastramonolidă și cel puțin 1,49% polifenoli totali, proce-
41 deul de extracție incluzând:

42 a. pulverizarea prin măcinare și cernerea printr-o sită cu dimensiunea ochiurilor de
43 250 μm;

44 b. solvenți utilizați pentru extracție apă distilată sau acidulată cu acid citric, malic,
45 ascorbic, alcool etilic, metilic sau acetat de etil, de preferință, alcool etilic 70%;

46 c. temperatura de extracție de circa 70°C;

47 d. durata fiecărei operații de extracție de cel puțin 30 min;

e. concentrare la temperaturi mai mici de 70°C și uscare prin liofilizare.

RO 131712 B1

Expunerea detaliată a invenției.	1
Descrierea detaliată a prezentei invenții și exemplele furnizate aici sunt ilustrative, deoarece variate modificări și ajustări sunt posibile, acestea fiind ușor evidente pentru o persoană de specialitate în domeniu. Modurile de realizare prezentate în continuare sunt ilustrative și nu limitează descrierea invenției așa cum va fi prezentată în continuare.	3 5
Materialul vegetal poate fi colectat din flora spontană sau poate fi obținut în condiții de cultură, cu respectarea bunelor practici agricole pentru plante medicinale. Materialul vegetal este purificat de corpurile străine de planta producătoare și de impurități și uscat în condiții adecvate de temperatură și umiditate, de preferat la umbră (temperaturi mai mici de 35°, umiditate sub 65%). Rădăcinile uscate sunt supuse pulverizării prin măcinare și cernute printr-o sită cu dimensiunea ochiurilor de 250 μm. Materialul vegetal se supune extracției de 3 ori cu un amestec etanol:apă 70:30 (v/v) la o temperatură de circa 70°C. Soluțiile extractive se filtrează, se reunesc și se concentrează prin metode cunoscute la temperaturi mai mici sau egale cu 70°C, de exemplu cu ajutorul unui evaporator rotativ. Soluția concentrată se supune apoi liofilizării la temperaturi mai mici de (-)50°C, când se obține un extract cu miros slab caracteristic (de zahăr caramelizat) și gust amar și slab acid. Extractul a fost testat <i>in vivo</i> (la șobolan) pentru efectul antialodinic și analgezic în durerea neuropată, iar toxicitatea a fost evaluată la șoarece, pe crustaceul acvatic <i>Artemia franciscana</i> , iar geno- și fitotoxicitatea pe radicule embrionare de <i>Triticum aestivum</i> L. Efectul antioxidant al extractului a fost evaluat spectrofotometric prin metoda cu DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrat). Reproducibilitatea procesului de obținere a extractului a fost evaluată prin analiza LC-MS a trei serii distincte de extract obținute prin procedeul descris mai sus.	7 9 11 13 15 17 19 21
Avantaje	23
Invenția oferă o soluție terapeutică pentru durerea neuropată indusă de chimioterapie, prezintă eficacitate în modelele non-clinice chiar la doze mai mici decât cele ale gabapentinei utilizate ca produs de referință, ceea ce este remarcabil ținând seama de natura de extract vegetal, cu o compoziție complexă, a produsului. De asemenea, extractul vegetal are un foarte bun profil de siguranță, evaluarea toxicității pe cale orală după doză unică la șoarece indicând că extractul se încadrează în categoria 5 (DL50 > 5000 mg/kg corp, p.o.) în conformitate cu datele incluse în Sistemul Global de Armonizare [Global Harmonised System (GHS) ENV/JM/MONO (2001)].	25 27 29 31
Procesul de obținere a extractului este simplu și eficient din punct de vedere al costurilor. Materia primă vegetală poate fi obținută la costuri modeste, iar solvenții utilizați în modalitatea preferată de realizare a invenției (apă și etanol), sunt ieftini și siguri. Extractul astfel preparat poate avea și alte beneficii pentru sănătate, cum ar fi combaterea oboselii sau ameliorarea funcțiilor sexuale, așa cum sugerează datele din literatură pentru extractele de <i>Withania radix</i> [44, 45].	33 35 37
În continuare se prezintă mai multe exemple de realizare a invenției.	
Exemplul 1	39
Se supun extracției conform metodei de mai sus 170 g de produs vegetal pur, pulverizat, se concentrează cu ajutorul unui evaporator rotativ la 70°C, iar soluția apoasă concentrată rezultată se supune liofilizării la -53°C. Se obțin circa 30 g de extract cu miros slab caracteristic (de zahăr caramelizat), gust amar și slab acid, foarte higroscopic (randament de extracție 17,79%, raport produs vegetal:extract (DER) 17:3).	41 43
Exemplul 2	45
Se supun extracției conform metodei de mai sus circa 506 g de pulbere de rădăcină de <i>Withania somniferae radix</i> , se concentrează cu ajutorul evaporatorului rotativ la 70°C, iar soluția concentrată se liofilizează la -53°C. Se obțin circa 92 g de extract cu aceleași caracteristici organoleptice și higroscopie (randament de extracție 91,93%, raport produs vegetal: extract 16,7:3).	47 49

1 Exemplul 3

3 S-au preparat trei serii de extract prin procedeul descris anterior, pornind de la circa
50 g de produs, provenit din trei surse comerciale diferite, fiecare obținut cu randamente
asemănătoare (19,87%, 16,1%, 18,85%). S-a studiat compoziția chimică a extractului prin
LC-MS și s-a observat o compoziție foarte asemănătoare de la serie la serie (fig. 1-3).

Analizele au fost efectuate cu un spectrometru de masă de tip triplu quadrupol AB
Sciex model API 3200, cuplat cu un sistem LC compus din autosampler, pompă cromatogra-
fică și degazor Agilent model 1.260 Infinity. S-a folosit o interfață de tip electrospray, operată
în mod de ionizare pozitiv. Compușii de interes au fost separați pe o coloană cromatografică
Luna PFP (2), 100 x 2 mm, 100 A (Phenomenex), cu o fază mobilă compusă din A) apă cu
0,1% acid formic și B) Acetonitril cu 0,1% acid formic, la un debit de 0,25 mL/min, în gradient
de compoziție pornind de la 90% A și ajungând la 85% B. Au fost efectuate experimente de
tip scanare generală pe un domeniu de masă, pentru identificarea ionilor moleculari și
scanare de produși de fragmentare a compușilor de interes, pentru elucidarea structurii.

Pe cromatograme au fost evidențiați 3 compuși cu masa moleculară 470,267 (ion
molecular $[M = H]^+ = 471,5$. Aceștia au fost tentativ identificați conform structurii și pe baza
datelor din literatura ca fiind withaferină A ($R_t = 6,25$ min), withanonă ($R_t = 6,37$) și
withanolidă A ($R_t = 6,49$) (fig. 4). Au fost de asemenea observați ionii moleculari pentru
withanolida B - $[M = H]^+ = 455,4$, sominonă - $[MHTi]^+ = 459,3$ și deoxiwithastramonolidă
- $[M = H]^+ = 457,3$.

Tot pentru controlul, reproductibilității procesului de obținere a extractului s-au deter-
minat polifenolii totali din patru serii de extract, utilizând metoda Folin-Ciocalteu. În primele
trei serii de extract, obținute din surse comerciale diferite pentru produsul vegetal, conținutul
în polifenoli totali - medie (grame) per 100 g extract (deviație standard) - a fost de 1,55 (0,05);
1,49 (0,06); și 1,68 (0,07). Pentru cea de-a patra serie, preparată cu un an mai înainte dintr-o
altă sursă comercială de *Withaniae radix*, conținutul în polifenoli totali a fost de 2,47 (0,10).

27 Exemplul 4

Dovezi experimentale. Toate experimentele pe animale pentru evaluarea eficacității
extractului în modele non-clinice au fost efectuate respectând normele de bioetică în cerce-
tarea pe animale de experiență în scop științific, conform Legii 43/2014 privind protecția
animalelor utilizate în scopuri științifice și a Directivei 2010/63/UE a Parlamentului European
și a Consiliului din 22 septembrie 2010, privind protecția animalelor utilizate în scopuri
științifice. Pentru evaluarea activității antinociceptive a extractului s-a utilizat un model de
neuropatie periferică indusă la șobolani albi, masculi, sușa Wistar, prin administrare de
paclitaxel 2 mg/kg corp, i.p. 4 zile consecutiv [Zbârcea C.E., Negreș S. et al., 2011]. Neuro-
patia periferică a fost evaluată prin sensibilitatea tactilă (alodinie și hiperalgezie), determinate
cu ajutorul aparatului Dynamic Plantar Aesthesiometer și cu ajutorul filamentelor manuale
Von Frey (Ugo Basile - Comerio, Italia).

Animale. Experimentul s-a realizat pe 44 de șobolani masculi, sușa Wistar, cu
greutatea medie de 191,50 g (d.s. 27,71 g), proveniți de la biobaza Universității de Medicină
și Farmacie „Carol Davila”, București. Șobolanilor li s-a oferit acces la hrană și la apă *ad
libitum*. Temperatura și umiditatea relativă au fost menținute la 21-24°C, respectiv 45-60%
pe tot parcursul experimentului. Acesta a avut loc pe parcursul a 17 zile în laboratorul de
Farmacologie experimentală a Facultății de Farmacie a UMF „Carol Davila” București.

RO 131712 B1

Animalele au fost împărțite în patru grupuri experimentale a câte 9-8 animale pe lot, astfel:	1
- Lotul martor (M): ser fiziologic 0,1 mL/corp, i.p., 4 zile consecutiv + apă distilată 1 mL/100 g corp, p.o., 17 zile consecutiv;	3
- Lotul paclitaxel (P): paclitaxel 2 mg/kg corp, i.p., 4 zile consecutiv + apă distilată 1 mL/100 g corp, p.o., 17 zile consecutiv;	5
- Lotul paclitaxel cu extract <i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal. (P+W): paclitaxel 2 mg/kg corp, i.p., 4 zile consecutiv + extract <i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal. 250 mg/kg corp, p.o., 17 zile consecutiv;	7
- Lotul paclitaxel cu gabapentin (P+Gaba): paclitaxel 2 mg/kg corp, i.p., 4 zile consecutiv + gabapentin 300 mg/kg corp, p.o., 17 zile consecutiv.	9
Materiale. Soluția de paclitaxel s-a preparat prin diluarea cu ser fiziologic a unei soluții 6 mg/mL (Actavis - România) până la 2 mg/mL și s-a păstrat la frigider (2-8°C) maximum 2 zile. Extratul uscat de <i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal. a fost obținut după cum s-a descris anterior. Acesta s-a administrat sub formă de soluție coloidală 2,5% (m/v) obținută prin dizolvare în apă distilată, păstrată la frigider (2-8°C), maximum 2 zile. Pentru grupul de control pozitiv s-a utilizat o soluție 3% de clorhidrat de gabapentin (Artesan Pharma - Germania), păstrată la frigider (2-8°C) maximum 2 zile.	11
Inducerea neuropaliei cu paclitaxel. La doze mici, cumulative, paclitaxel produce alodinie și neuropatie dureroasă la șobolan, caracterizată prin scăderea pragurilor de percepție și de reacție la durere mecanică și termică. S-a indus neuropatie la șobolani albi, masculi sușa Wistar, prin administrare de paclitaxel 2 mg/kg corp i.p. zilnic, timp de 4 zile consecutiv [Flatters SJ et al., 2006, modificată; Zbârcea C.E., Negreș S. et al., 2011].	13
La diferite momente ale experimentului s-a evaluat sensibilitatea tactilă cu ajutorul celor două teste. Lestările au fost efectuate în zile diferite, după o oră de la administrarea per os a tratamentului. Reprezentarea grafică a protocolului experimental este redată în fig. 1.	15
Evaluarea statistică a datelor experimentale s-a realizat prin analiză dispersională unifactorială (one way ANOVA), iar pentru analizele post-hoc s-a utilizat contraste relative neparametrice de tip Tukey și intervale simultane de încredere, utilizând funcția de transformare „logit” pentru aproximarea asimptotică.	17
Rezultate. Forța maximă suportată pentru stimulul de 4 g/s pentru fiecare din loturile experimentale (M, P, P+W și P+Gaba) la diferite intervale de timp este prezentată în fig. 2. Dacă la momentul inițial nu au existat diferențe semnificative între cele patru loturi în privința forței maxime suportate, după patru zile grupul tratat numai cu paclitaxel a suportat forțe mult mai mici în comparație cu grupul martor (fără paclitaxel) sau grupul tratat cu gabapentin. Extractul de <i>Withania</i> nu a avut decât un efect foarte limitat, nesemnificativ statistic în ziua a 4-a, dar acesta a devenit tot mai pronunțat, la ziua a 10-a nedeosebindu-se de grupul martor, ca și la ziua a 17-a, în care însă nu s-a mai deosebit semnificativ nici de gabapentin ($p = 0,929$), diferențele fiind însă semnificative față de grupul tratat cu paclitaxel ($p < 0,001$). Efectul este cu atât mai remarcabil cu cât este produs de un extract complex și nu de o substanță pură, iar doza utilizată pentru extract a fost inferioară celei a substanței de referință (gabapentin 300 mg/kg corp, extractul de <i>Withania somnifera</i> , 250 mg/kg corp).	19
O variație foarte asemănătoare s-a înregistrat și în privința parametrului timp de răspuns (fig. 3): la momentul inițial nu au existat diferențe între cele patru loturi, iar timpul de răspuns s-a scurtat rapid (ziua a 4-a) pentru lotul tratat doar cu paclitaxel. Efectul extractului de <i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal s-a instalat lent, în ziua a 4-a timpul de răspuns nefiind semnificativ superior celui observat la grupul tratat doar cu paclitaxel, dar începând cu ziua a 10-a timpul de răspuns a fost superior grupului martor negativ (netratat cu paclitaxel), iar	21
	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

1 în ziua a 17-a diferențele minore față de gabapentin au fost ne semnificative statistic. Și aici
este valabilă mențiunea că aceste efecte sunt cu atât mai remarcabile cu cât se referă la un
3 extract vegetal și nu la o substanță pură, iar administrarea s-a făcut la o doză inferioară celei
a gabapentinei (250 mg/kg versus 300 mg/kg).

5 Pentru filamentele von Frey, variația sensibilității tactile (exprimate prin pragul de
răspuns - în grame - al forței la care apare 50% din răspuns) este reprezentată grafic în fig.
7 4. Se observă o evoluție ușor diferită față de măsurătorile realizate în privința forței maxime
și a timpului de răspuns, în sensul că dacă acolo s-a observat o evoluție ascendentă a
9 efectului, cu un maxim atins în ziua a 17-a, în cazul utilizării filamentelor von Frey efectul
maxim a fost înregistrat în ziua a 10-a (când efectul a fost ușor superior, chiar dacă nu
11 semnificativ statistic) față de gabapentină. În schimb, în ziua a 17-a s-a observat o diminuare
a efectului măsurat cu ajutorul filamentelor von Frey, acesta fiind inferior gabapentinei (și
13 pentru aceasta observându-se o diminuare a efectului în comparație cu ziua a 10-a), deși
non-inferior față de grupul martor (la care nu s-a indus neuropatie cu paclitaxel), însă nu s-a
15 deosebit semnificativ statistic nici față de grupul tratat doar cu paclitaxel. Aceste date indică
o diminuare a efectului măsurat cu ajutorul filamentelor von Frey în ziua a 17-a față de ziua
17 a 10-a, însă absența unor efecte semnificative statistic cu această modalitate de evaluare
a efectului în ziua a 17-a trebuie privită și în contextul dimensiunii limitate a eșantioanelor;
19 graficul (fig. 4) indică un trend în favoarea extractului de *Withania* față de grupul tratat doar
cu paclitaxel, iar observația că doza de extract utilizată a fost inferioară celei utilizate pentru
21 gabapentin (250 mg/kg versus 300 mg/kg este validă și aici).

În concluzie, datele experimentale indică pentru extractul de *Withania somnifera* (L.)
23 Dunal un efect anti-alodinic similar celui observat la gabapentin la evaluarea cu ajutorul
esteziometrului plantar dinamic și un efect similar celui observat la gabapentin la evaluarea
25 cu ajutorul filamentelor von Frey în ziua a 10-a, dar nu și în ziua a 17-a a experimentului. Mai
mult, aceste efecte remarcabile au fost obținute cu un extract vegetal complex, multicom-
27 ponent, și nu cu o substanță pură, iar doza utilizată pentru extract a fost inferioară celei de
gabapentin.

29 Pentru a evalua eventuala contribuție a unui potențial efect antioxidant al extractului
la efectul farmacologic s-a investigat capacitatea extractului de a neutraliza radicalii liberi prin
31 metoda bazată pe DPPH. S-a obținut o concentrație inhibitorie mediană (CI_{50}) de $632,38 \pm$
 $1,96$ mg/L (medie \pm deviație standard) (IC 95%, 448,41-816,35). IC_{50} astfel determinată
33 experimental este relativ mare (indicând un efect antioxidant modest) în comparație cu cea
determinată în condiții identice pentru acidul ascorbic (197,16; IC 95% 191,02-203,31),
35 quercetol (quercetin) (67,58; IC 95% 51,07-84,10) sau acid galic (36,50; IC 95% 27,41-
45,59). Aceasta sugerează că nu mecanismul antioxidant este esențial în inducerea efectului
37 antialodinic și analgezic al extractului.

Exemplul 5

39 Dovezi experimentale. Conform ghidurilor OECD (Organizația pentru Cooperare și
Dezvoltare Economică) pentru determinarea toxicității la șoarece, după doză unică
41 administrată per os [46], s-a utilizat o metodă alternativă de estimare a toxicității după doză
unică a extractului, metoda dozelor fixe (OECD 420/2001) utilizând testul limită. Experimentul
43 s-a realizat pe colectivitate de șoareci masculi, sușa NMR.I, proveniți de la biobaza
Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București. Șoarecilor li s-a oferit acces
45 la hrană și la apă *ad libitum*. Temperatura și umiditatea relativă au fost menținute la 21-24°C,
respectiv 45-60% pe tot parcursul experimentului și determinate cu ajutorul unui higrometru.

RO 131712 B1

Toate procedurile au fost efectuate respectând normele de bioetică în cercetarea pe animale de experiență în scop științific, conform Legii 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice și Directivei 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010, privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice. 1 3

Doza limită a fost de 2000 mg/kg corp, ce a fost administrată unui singur animal de experiență, urmată de administrarea ulterioară la 4 animale, dacă nu se înregistrează nici un deces. Extractele au fost administrate în condiții de post alimentar, timp de 4 h înaintea administrării. Hrana a fost adăugată la 2 h după administrarea extractelor de testat, iar rozătoarele au avut acces la apă pe toată perioada determinării. Animalele au fost alese la întâmplare, marcate pentru identificarea individuală, și păstrate în cuștile lor. S-a utilizat testul limită, care prevede utilizarea unei doze inițiale de 2000 mg/kg corp, deoarece literatura de specialitate sugerează că mortalitatea este puțin probabilă la o doză unică mare din extractele testate. Pentru că nu s-a înregistrat letalitate, după 48 h de la prima administrare p.o., s-au mai luat încă 4 șoareci pentru fiecare lot, ce au primit în doză unică, p.o. același extract, în doza de 2000 mg/kg cp. După administrare, șoarecii au fost observați individual în primele 60 min, apoi periodic în primele 4 h și zilnic timp de 14 zile. S-a urmărit apariția următoarelor efecte: tremor, convulsii, hipersalivație, diaree, letargie, somn și comă. Masa corporală a fost determinată inițial înainte de administrare, la 2, 4, 7, 10, 14 zile de la începerea experimentului. 5 7 9 11 13 15 17 19

Pentru lotul tratat cu extractul uscat din *Withania somnifera* (L.) Dunal. s-a observat cea mai mare creștere a masei corporale pe tot parcursul experimentului (în experiment au fost evaluate alte trei extracte vegetale, plus un grup martor). Conform ghidului OECD 420 pentru determinarea toxicității orale a substanțelor după doză unică, extractul de *Withania somnifera* (L.) Dunal se încadrează în categoria 5 (DL50 > 5000 mg/kg corp, p.o.) în conformitate cu datele incluse în Sistemul Global de Armonizare [Global Harmonised System (GHS) - ENV/JM/MONO (2001) 6, 2001] [47]. 21 23 25

Desene explicative 27

Fig. 1, redă cromatograma extrasă pentru ionul molecular $[M = H]^+ = 471,5$ după analiza primei serii de extract. 29

Fig. 2, redă cromatograma extrasă pentru ionul molecular $[M = H]^+ = 471,5$ după analiza celei de-a doua serii de extract. 31

Fig. 3, redă cromatograma extrasă pentru ionul molecular $[M = H]^+ = 471,5$ după analiza celei de-a treia serii de extract. 33

Fig. 4, reprezintă grafic protocolul experimental utilizat în cadrul exemplului 4.

Fig. 5, redă variația forței maxime suportate pentru stimulul de 4 g/sec pentru cele patru loturi experimentale pe parcursul experimentului (media și intervalul de încredere 95%). Se observă cum în ziua a 17-a extractul de *Withania somnifera* (L.) Dunal nu se deosebește semnificativ nici de grupul martor (fără neuropatie indusă), nici de grupul tratat cu gabapentin. 35 37 39

Fig. 6, redă variația timpului de răspuns pentru cele patru loturi experimentale pe parcursul experimentului (media și intervalul de încredere 95%). Se observă cum în ziua a 17-a extractul de *Withania somnifera* (L.) Dunal nu se deosebește semnificativ nici de grupul martor (fără neuropatie indusă), nici de grupul tratat cu gabapentin. 41 43

Fig. 7, reprezintă grafic efectul extractului vegetal din *Withania somnifera* (L.) Dunal și al gabapentinei asupra neuropatiei indusă de paclitaxel, exprimat prin pragul de răspuns al forței la care apare 50% din răspuns, pe parcursul experimentului (medie și interval de încredere 95%). 45 47

1 Bibliografie

- 3 1. Murinson B. Foreward, în volumul: Neuropathic Pain: Mechanisms, Diagnosis and
5 Treatment. Simpson DM, McArthur JC, RH Dworkin (Ed.). Oxford University Press, Oxford,
7 2012, p. viii.
- 7 2. Campbell J.N., Meyer R.A., Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*. 2006; 52(1):
9 77-92.
- 9 3. von Hehn C.A., Baron .R, Woolf C.J., Deconstructing the neuropathic pain
11 phenotype to reveal neural mechanisms, *Neuron*. 2012, Feb 23;73(4): 638-52.
- 11 4. Di Cesare Mannelli L., Pacini A., Corti F., Boccella S., Luongo L., Esposito E.,
13 Cuzzocrea S., Maione S., Calignano A., Ghelardini C., Antineuropathic Pro file of N-
15 Palmitoylethanolamine in a Rat Model of Oxaliplatin-Induced Neurotoxicity. *PLoS One*. 2015;
17 10(6):e0128080.
- 15 5. De Iuliis F., Taglieri L., Salerno G., Lanza R., Scarpa S., Taxane induced
17 neuropathy in patients affected by breast cancer: Literature review. *Crit Rev Oncol Hematol*.
19 2015 May 11. pii:S1040-8428(15)00088-8.
- 17 6. Attal N., Cruccu G., Haanpää M., Hansson P., Jensen T.S., Nurmikko T., Sampaio
19 C., Sindrup S., Wiffen P.; EFNS Task Force. EFNS guidelines on pliarmacological treatment
21 of neuropathic pain. *Eur J Neurol*. 2006; 13(11): 1153-69.
- 21 7. Attal N., Cruccu G., Baron R., Haanpää M., Elansson P., Jensen T.S., Nurmikko
23 T.; European Federation of Neurological Societies. EFNS guidelines on the pliarmacological
25 treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J. Neurol*. 2010; 17(9): 1113-e88.
- 23 8. Kern K.U., Nalamachu S., Brasseur L., Zakrzewska J.M. Can treatment success
25 with 5% lidocaine medicated plaster be predicted in cancer pain with neuropathic
27 components or trigeminal neuropathic pain? *J. Pain Res*. 2013; 6:261-80.
- 27 9. Beal B., Moeller-Bertram T., Schilling J.M., Wallace M.S. Gabapentin for once-daily
29 treatment of post-herpetic neuralgia: a review. *Clin Interv Aging*. 2012;7:249-55.
- 29 10. Vargas-Espinosa M.L., Sanmarti-Garcia G., Vázquez-Delgado E., Gay-Escoda
31 C., Antiepileptic drugs for the treatment of neuropathic pain: a systematic review. *Med Oral
33 Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(5):e786-93.
- 31 11. Moore R.A., Derry S., Aldington D., Cole .P, Wiffen P.J., Amitriptyline for
33 neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;
35 12:CD008242.
- 35 12. Sacks G.M., Unmet need in the treatment of postherpetic neuralgia. *Am J. Manag
37 Care*. 2013;19(1 Suppl):S207-13.
- 37 13. Chaparro L.E., Wiffen P.J., Moore R.A., Gilron I., Combination pharmacotherapy
39 for the treatment of neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;
41 7:CD008943.
- 39 14. Muthuraman A., Singh N., Jaggi A.S., Ramesh M., Drug Therapy of Neuropathic
41 Pain: Current Developments and Future Perspectives. *Curr Drug Targets*. 2013. [Epub
43 ahead of print].
- 43 15. Cao P., Cheng X., Huo J., Wang X., Hu J., Cai X., Yang Y., Hu C., Wei G.
45 Pharmaceutical composition for treating cancer and use thereof. US Patent, 9,005,678B1,
47 Apr. 14, 2015.
- 45 16. Guoqing L., Traditional Chinese medicinal preparation for treating headaches.
47 CN 103845622 (A). 11.06.2014.
- 47 17. Shuke W., Aerosol spray for treating cervical spondylosis. CN103356864 (A).
2013. 10. 23.

RO 131712 B1

18. Shuke W., Aerosol spray for treating cervical spondylosis. CN103356863 (A). 2013. 10.23. 1
19. Shuke W., Aerosol spray for treating cervical spondylosis. CN103356850 (A). 2013. 10.23. 3
20. Shuke W., Jingtongling aerosol spray. CN103356834 (A). 2013. 10. 23. 5
21. Shuke W., Jingtongling aerosol spray. CN103356761 (A). 2013. 10. 23. 5
22. Xugang B., Medicine for treating neuropathic headache and preparation method thereof, CN103055005 (A). 2013.04. 24. 7
23. Xie B., Chinese herbal medicine prescription for curing cervical vertebra, lumbar, neuralgia and femoral head necrosis. CN101254232 (A). 2008.09.03. 9
24. Marchetti M., Spacagnini G., Porcaro P., De Grossi Mazzorin F., Composition for the prevention and treatment of migraine or neuropathic pain. European Patent Application, EP 2 845 589 A1, 11.03.2015. 11
13
25. Qingxia Z., Hot physiotherapy cervical vertebra massage pillow. CN203182518 (U). 11.09.2013. 15
26. Gannon J.M., Forrest P.E., Roy Chengappa K.N., Subtle changes in thyroid indices during a placebo-controlled study of an extract of *Withania somnifera* in persons with bipolar disorder, *J. Ayurveda Integr Med.* 2014; 5(4):241-5. 17
27. Raghavan A., Shah Z.A., *Withania somnifera*: a pre-clinical study on neuroregenerative therapy for stroke. *Neural Regen Res.* 2015; 10(2): 183-5. 19
28. Singh P., Guleri R., Singh V., Kaur G., Kataria H., Singh B., Kaur G., Kaul S.C., Wadhwa R., Pati P.K., Biotechnological interventions in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2015: 1-20. [Epub ahead of print]. 21
23
29. Masevhe N.A., McGaw L.J., Eloff J.N., The traditional use of plants to manage candidiasis and related infections in Venda, South Africa. *J. Ethnopharmacol.* 2015; 168:364-72. 25
30. Gorelick J., Rosenberg R., Smotrich A., Hanus L., Bernstein N., Hypoglycemic activity of withanolides and elicited *Withania somnifera*. *Phytochemistry.* 2015 Mar 18. pii: S0031-9422(15)00095-3. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.02.029. [Epub ahead of print]. 27
29
31. Senthil K., Thirugnanasambantham P., Oh T.J., Kim S.H., Choi H.K., Free Radical Scavenging Activity and Comparative Metabolic Profiling of In Vitro Cultured and Field Grown *Withania somnifera* Roots. *PLoS One.* 2015 Apr 14;10(4):e0123360. 31
32. Bhattarai J.P., Han S.K., Phasic and tonic type A γ -Aminobutyric acid receptor mediated effect of *Withania somnifera* on mice hippocampal CA1 pyramidal Neurons, *J. Ayurveda Integr Med.* 2014; 5(4):216-22. doi: 10.4103/0975-9476.146541. 33
35
33. Manjunath M.J., Muralidhara. Standardized extract of *Withania somnifera* (Ashwagandha) markedly offsets rotenone-induced locomotor deficits, oxidative impairments and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *J. Food Sci. Technol.* 2015; 52(4):1971-81. 37
34. Khan M.A., Subramanyam M., Arora V.K., Banerjee B.D., Ahmed R.S., Effect of *Withania somnifera* (Ashwagandha) root extract on amelioration of oxidative stress and autoantibodies production in collagen-induced arthritic rats. *J. Complement Integr Med.* 2015; 12(2):117-25. 39
41
35. Savai J., Varghese A., Pandita N., Chintamaneni M., Investigation of CYP3A4 and CYP2D6 Interactions of *Withania somnifera* and *Centella asiatica* in Human Liver Microsomes. *Phytother Res.* 2015; 29(5):785-90. 43
45
36. Andallu B., Radhika B., Hypoglycemic, diuretic and hypocholesterolemic effect of winter cherry (*Withania somnifera*, Dunal) root. *Indian J. Exp. Biol.* 2000; 38(6):607-9. 47

RO 131712 B1

- 1 37. Chaudhary G., Sharma U., Jagannathan N.R., Gupta Y.K., Evaluation of *Withania*
3 *somnifera* in a middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Clin Exp Pharmacol*
 Physiol. 2003; 30(5-6):399-404.
- 5 38. Abou-Douh A.M., New withanolides and other constituents from the fruit of
 Withania somnifera. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2002; 335(6):267-76.
- 7 39. Kuttan G., Use of *Withania somnifera* Dunal as an adjuvant during radiation
 therapy. *Indian J. Exp. Biol.* 1996; 34(9):854-6.
- 9 40. Bhattarai J.P., Park S.J., Han S.K., Potentiation of NMDA receptors by *Withania*
 somnifera on hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Am J. Chin Med.* 2013; 41(3):503-13.
- 11 41. Kataria H., Wadhwa R., Kau S.C., Kaur G., Water Extract from the Leaves of
 Withania somnifera Protect RA Differentiated C6 and IMR-32 Cells against Glutamate-
 Induced Excitotoxicity. *PLoS One.* 2012; 7 (5): e37080. doi:10.1371/journal.pone.0037080.
- 13 42. Bhattarai J.P., Ah Park S., Han S.K., The methanolic extract of *Withania*
 somnifera ACTS on GABAA receptors in gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons
15 in mice. *Phytother Res.* 2010; 24(8):1147-50.
- 17 43. Yin H., Cho D.H., Park S.J., Han S.K., GABA-mimetic actions of *Withania*
 somnifera on substantia gelatinosa neurons of the trigeminal subnucleus caudalis in mice.
 Am J Chin Med. 2013;41(5):1043-51.
- 19 44. Dongre S., Langade D., Bhattacharyya S., Efficacy and Safety of Ashwagandha
 (*Withania somnifera*) Root Extract in Improving Sexual Function in Women: A Pilot Study.
21 *Biomed Res Int.* 2015; 2015:284154.
- 23 45. Biswal B.M., Sulaiman S.A., Ismail H.C., Zakaria H., Musa KI., Effect of *Withania*
 somnifera (Ashwagandha) on the development of chemotherapy-induced fatigue and quality
 of life in breast cancer patients. *Integr Cancer Ther.* 2013; 12(4):312-22.
- 25 46. *** - OECD (2001) Test Guideline 420. OECD Guideline for Testing of Chemicals.
 Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure.
- 27 47. *** - ENV/JM/MONO (2001) 6. - Harmonised Integrated Classification System For
 Human Health And Environmental Hazards Of Chemical Substances And Mixtures. Adopted
29 14 august 2001.

RO 131712 B1

Revendicare

	1
Extract pentru tratamentul durerii neuropate asociate chimioterapiei, caracterizat prin aceea că , se obține din rădăcina de <i>Withania somnifera (L.) Dunal</i> prin extracție repetată cu solvenți, conține withaferină A, withanonă, withanolidă A, withanolidă B, sominonă, deoxiwithastramonolidă și cel puțin 1,49% polifenoli totali, procedeul de extracție incluzând:	3
	5
	7
a. pulverizarea prin măcinare și cernerea printr-o sită cu dimensiunea ochiurilor de 250 μm;	9
b. solvenți utilizați pentru extracție apă distilată sau acidulată cu acid citric, malic, ascorbic, alcool etilic, metilic sau acetat de etil, de preferință, alcool etilic 70%;	11
c. temperatura de extracție de circa 70°C;	
d. durata fiecărei operații de extracție de cel puțin 30 min;	13
e. concentrare la temperaturi mai mici de 70°C și uscare prin liofilizare.	

RO 131712 B1

(51) Int.Cl.

A61K 36/81 (2006.01)

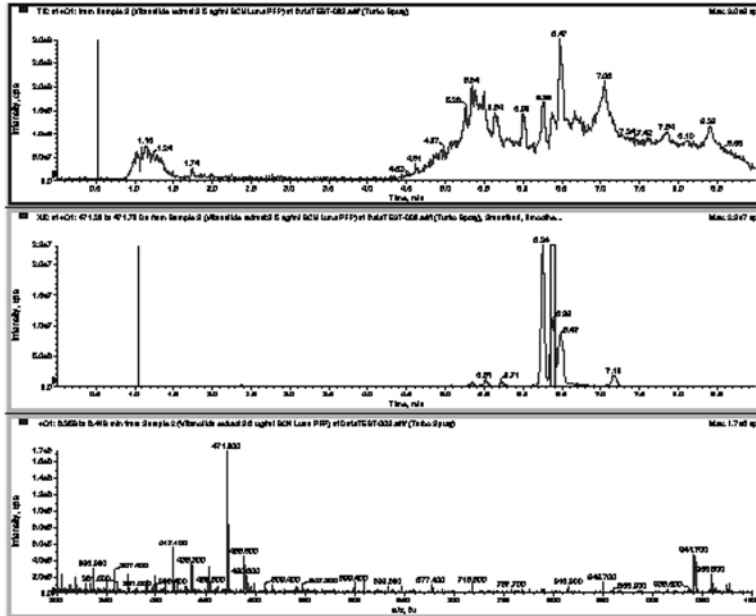


Fig. 1

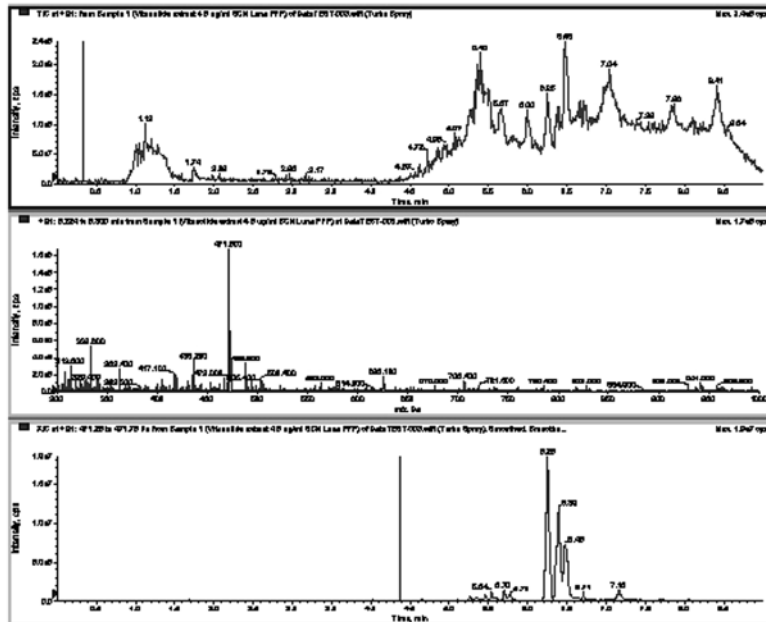


Fig. 2

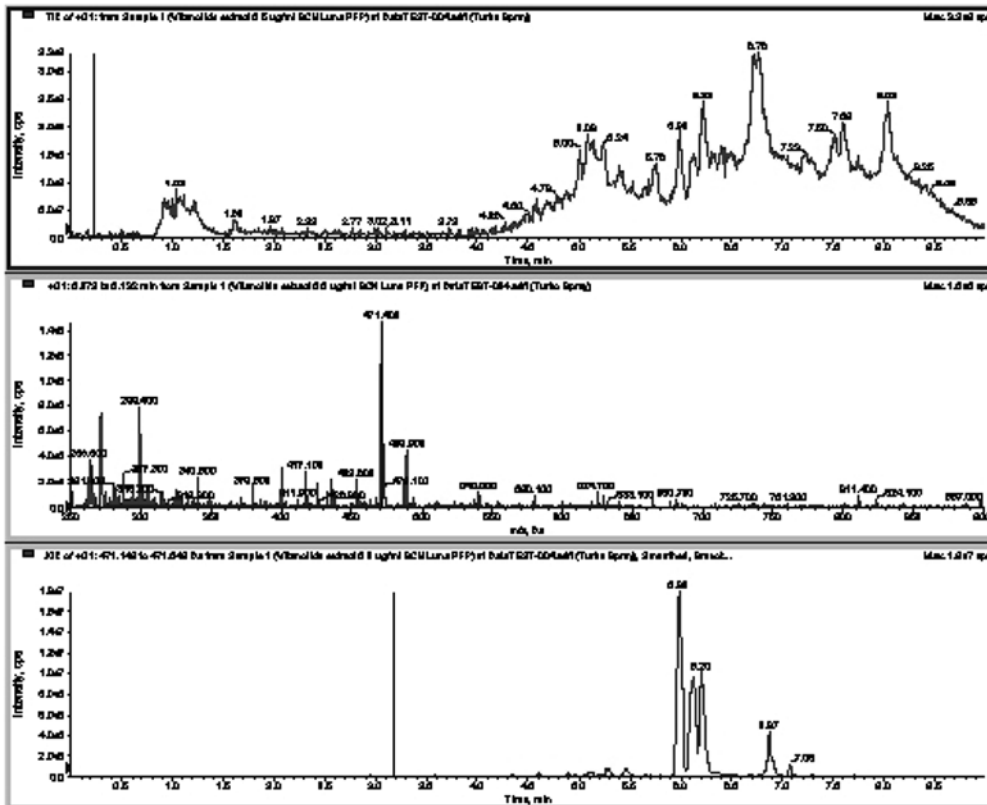


Fig. 3

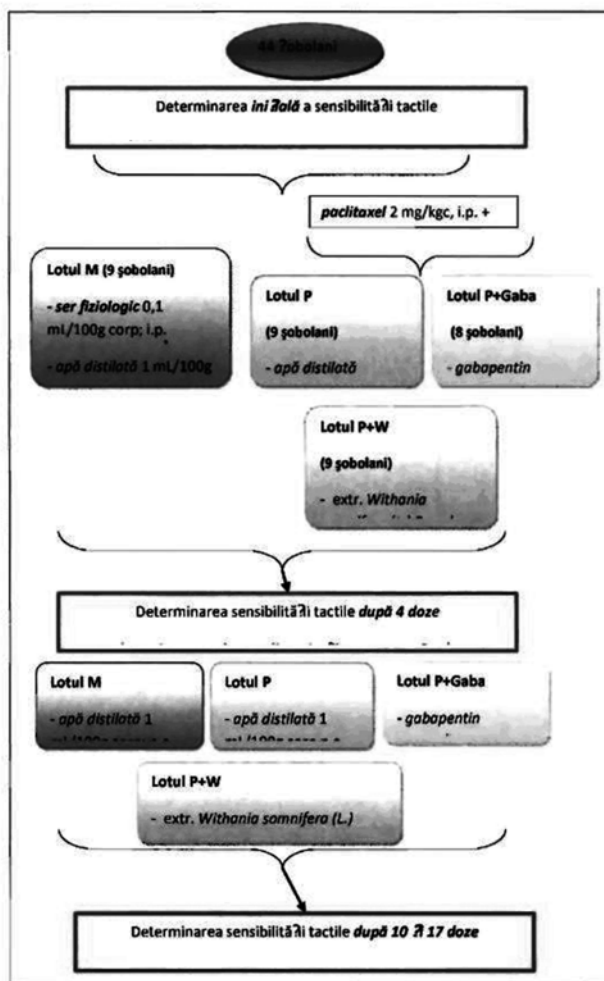


Fig. 4

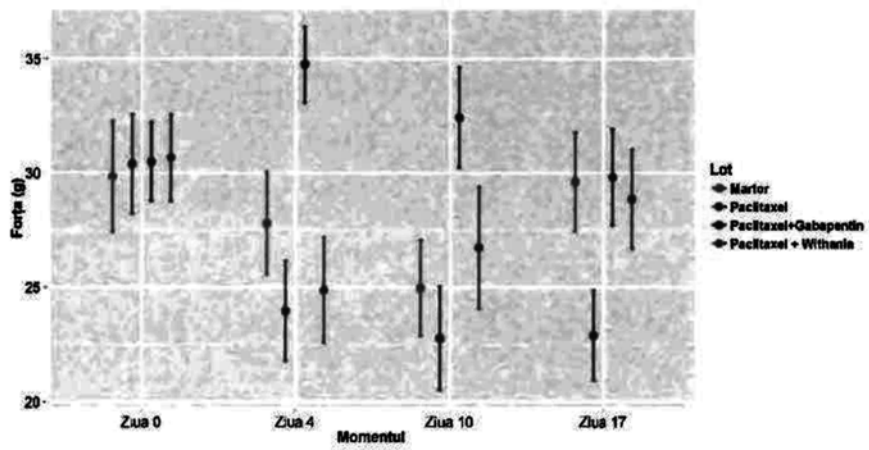


Fig. 5

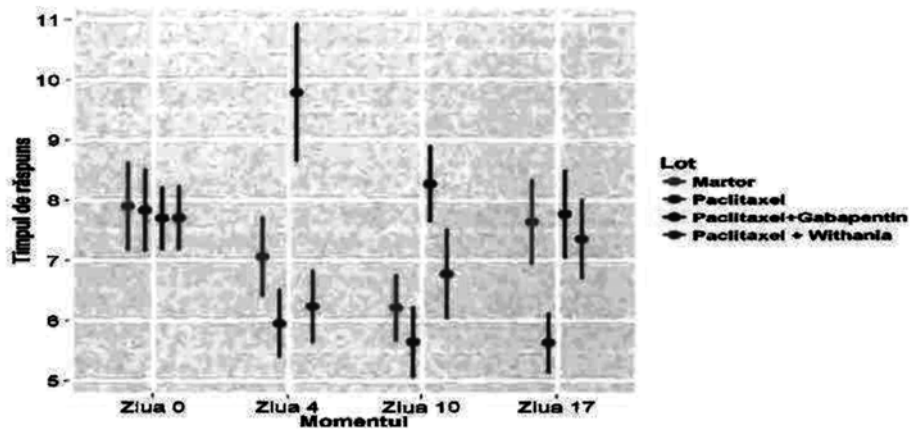


Fig. 6

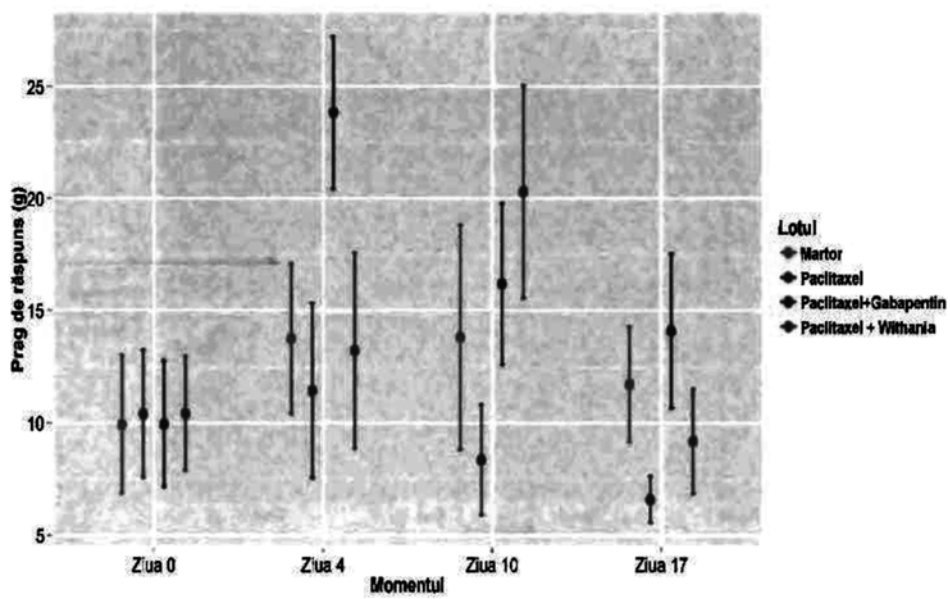


Fig. 7

