



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00625

(22) Data de depozit: 07/09/2017

(41) Data publicării cererii:
30/08/2018 BOPI nr. 8/2018

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN
BUCUREȘTI, STR. DIONISIE LUPU NR. 37,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• DINU-PIRVU CRISTINA ELENA,
STR. GHEORGHE LAZĂR NR. 10, ET. 1,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• ANUȚA VALENTINA, STR. ROTUNDĂ
NR. 4, BL. Y1, SC. Z, ET. 1, AP. 10, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• VELESCU BRUNO ȘTEFAN,
STR. NEAGOE VODĂ NR. 53, BACĂU, BC,
RO;

• NIȚULESCU GEORGE MIHAI,
ȘOS. OLTENIȚEI NR. 40-44, BL. 6A, SC. 4,
ET. 7, AP. 145, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
• OLARU OCTAVIAN TUDOREL,
STR. ZBOINA NEAGRĂ NR. 5, BL. 98, SC. 1,
ET. 1, AP. 8, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• GHICA MIHAELA VIOLETA,
CALEA CRÂNGAȘI NR. 26-28, BL. 48-49,
SC. A, ET. 2, AP. 4, SECTOR 6, BUCUREȘTI,
B, RO;
• ORȚAN ALINA, BD. LASCĂR CATARGIU
NR. 5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• POPA OVIDIU, CALEA GRIVIȚEI NR. 206,
BL. K, SC. D, AP. 26, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BĂBEANU NARCISA, ȘOS. VIRTUȚII
NR. 5, BL. R2, SC. 2, AP. 50, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **EXTRACTE STANDARDIZATE DIN ANTHRISCUS
SYLVESTRIS - PROCEDU DE OBTINERE ȘI UTILIZARE
TERAPEUTICĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un extract vegetal din specia *Anthriscus sylvestris* cu proprietăți antiinflamatoare, și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Extractul, conform invenției, are un conținut 4,44...6,56 g polifenoli totali exprimați în echivalenți gram acid galic/100 g extract material vegetal uscat. Procedeu, conform invenției, constă în prepararea și caracterizarea materiei prime constând din părțile aeriene ale speciei vegetale *Anthriscus sylvestris*, după care urmează extracția principiilor active la rece într-un agitator la

temperatura camerei cu agitare intermitentă timp de 6...24 h, cu un solvent de tip amestec de alcool etilic și apă sau alcool etilic absolut, într-un raport cantitativ material vegetal: solvent de 1:10...1:12,5, urmată de concentrarea soluțiilor extractive la un evaporator rotativ la temperatura de 40°C și uscarea extractelor prin liofilizare.

Revendicări: 3
Figuri: 3



12

| | |
|--|------------|
| ROMANIA DE STAT PENTRU INVENTII SI MARCI | |
| Cerere de brevet de inventie | |
| Nr. | 2017 0625 |
| Data depozit | 07-09-2017 |

EXTRACTE STANDARDIZATE DIN *ANTHRISCUS SYLVESTRIS* – PROCEDEU DE OBTINERE SI UTILIZARE TERAPEUTICA

Prezenta inventie se refera la o serie de extracte vegetale obtinute din o specie a genului *Anthriscus*, respectiv *Anthriscus sylvestris*, caracterizate calitativ si cantitativ, la procedeul de obtinere si la proprietatile antiinflamatoare ale acestora cu utilizabilitate terapeutică.

Compușii polifenolici prezintă un interes deosebit datorită numeroaselor acțiuni farmacologice, printre care și proprietățile antiinflamatoare [Joseph SV și colab., *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56(3):419-44] rezultate prin modificarea căilor de semnalizare celulară, fiind demonstrată reglarea expresiei modulatorilor pro-inflamatori [Santangelo C și colab., *Ann Ist Super Sanita.* 2007;43(4):394-405].

Anthriscus sylvestris (L.) Hoffm. este cunoscut sub numele de hasmațuchi și aparține familiei *Apiaceae*, fiind o plantă sălbatică comună în majoritatea regiunilor temperate. Reprezintă o resursă disponibilă și ieftină, cu un puternic potențial terapeutic. Rădăcinile uscate de *Anthriscus sylvestris* se utilizează în mod tradițional în țările asiatice ca antipiretic, analgezic și remediu în tuse. Utilizarea unei plante spontane, cu o foarte bună distribuție naturală și ușor de cultivat oferă o soluție ieftină de tratament prin potențialul său antiinflamator. *Anthriscus sylvestris* reprezintă o soluție foarte bună pentru pregătirea unui produs de uz topic pe baza potențialului farmacologic și a toxicității reduse.

Invenția de față se referă la obținerea unor extracte vegetale din *Anthriscus sylvestris* și la evaluarea proprietăților antiinflamatorii în vederea utilizării ca tratament dermic. Obiectul invenției constă într-un procedeu de obținere a extractelor vegetale caracterizate calitativ și cantitativ, la verificarea reproductibilității procesului și evaluarea capacității antiinflamatorii prin model experimental pe șobolan.

Extractele conform invenției sunt reprezentate de extracte vegetale totale uscate din *Anthriscus sylvestris*, cu un conținut de polifenoli totali exprimați în acid galic de 4,44 – 6,56 g%. Procedeul conform invenției presupune extracția la rece sau la cald cu amestec de alcool etilic și apă în diverse proporții sau alcool etilic absolut, în raport cantitativ

volum material vegetal:solvent de 1:10...1:12,5, urmată de concentrarea la evaporator rotativ și uscarea prin liofilizare. Extracția la rece se realizează în flacoane Erlenmeyer plasate într-un agitator reciprocant la temperatura camerei cu agitare intermitentă timp de 6...24 h. Extracția la cald se realizează la un aparat Soxhlet timp de 6 h.

Pentru caracterizarea calitativă a extractelor și verificarea reproductibilității procesului de obținere s-au efectuat amprentele extractelor uscate prin cromatografie în strat subțire (CSS), spectrometrie infraroșu (IR) și UV/VIS. Verificarea reproductibilității procesului de obținere s-a realizat pe câte trei șarje din fiecare extract.

Avantajele aplicării invenției sunt:

- valorificarea speciei spontane *Anthriscus sylvestris*;
- obținerea extractelor vegetale se face utilizând solvenți netoxici pentru om și nepoluanți;
- extractele vegetale sunt obținute printr-un procedeu cu un randament bun de extracție a principiilor active;
- extractele obținute prezintă proprietăți antiinflamatoare;

Descrierea pe scurt a desenelor:

- fig.1 prezintă amprenta IR a trei șarje de extract de *Anthriscus sylvestris* în alcool etilic 60% (v/v) de *Anthriscus sylvestris*;
- fig.2 prezintă amprenta CSS cu detecție UV la $\lambda=366$ nm și densitogramele la $\lambda=254$ nm a șarjelor de extract de *Anthriscus sylvestris* în alcool etilic 60% (v/v) ;
- fig.3 prezintă evaluarea acțiunii antiinflamatoare a extractului hidroalcoolic de *Anthriscus sylvestris* în alcool etilic 60% (v/v).

În continuare invenția este ilustrată printr-un exemplu nelimitativ de realizare.

EXEMPLUL 1

Descrierea etapelor de obținere a extractului de *Anthriscus sylvestris*:

Au fost obținute 3 șarje de extract.

Etapa I. Prelucrarea materiei prime (produsul vegetal)

Materialul proaspăt constituit din părțile aeriene ale speciei vegetale *Anthriscus sylvestris* a fost recoltat și supus sortării. Materia rezultată, denumită în continuare produs

vegetal, conține mai puțin de 0,5% impurități provenite din alte specii vegetale și mai puțin de 1,5% impurități provenite din aceeași plantă.

Materialul vegetal a fost uscat la temperatura camerei până la o umiditate de 12-14% și apoi la etuva la 40-50°C până la o umiditate de 8-9%.

Materialul vegetal uscat a fost măcinat și trecut prin sita de 2 mm; pentru extracție s-a păstrat materialul reținut de sita de 1 mm;

Etapa II. Extracția principiilor active

Extracția principiilor active s-a realizat în alcool etilic 60% (v/v), la cald, folosind un extractor Soxhlet, la un raport solvent produs vegetal 12,5:1 (v/v) și o durată de extracție de 6 h. Pentru fiecare șarjă s-au folosit 50 g de produs vegetal.

Etapa III. Concentrarea soluției extractive

Concentrarea s-a efectuat la un evaporator rotativ Ingos RVO 004, sub vid, la temperatura de 40 °C, până la obținerea unei suspensii apoase cu un volum de aproximativ 1/10 ori mai mic decât volumul inițial.

Etapa IV. Uscarea prin liofilizare a suspensiei apoase concentrate

Uscarea soluției extractive concentrată a fost realizată prin liofilizarea acesteia la un aparat ScanVac Coolsafe, la o temperatură de liofilizare de -55°C timp de 48 h. Randamentul de obținere a extractului uscat a fost de $22,30 \pm 1,68$ % cu un conținut de 4,44 – 6,56 g polifenoli totali exprimați în echivalenți acid galic/100 g extract uscat.

Etapa V. Condiționarea extractelor uscate

Extractul obținut a fost condiționat în flacoane din sticlă brună cu dop din pvc, bine închise, la întuneric și conservat la temperatura camerei.

Verificarea reproductibilității procesului de obținere

Verificarea reproductibilității procesului de obținere prin cromatografie în strat subțire.

S-au folosit plăcuțe de aluminiu Merck silicagel F60 254; faza mobilă utilizată pentru identificarea heterozidelor flavonice a fost acetat de etil:acid acetic:acid formic:apă (72:7:7:14) și pentru identificarea agliconilor flavonici a fost toluen:acetat de etil:acid formic (5:3:1). Achiziția spectrelor și a densitogramelor s-a făcut cu ajutorul unui aparat CAMAG TLC Scanner 3.

- *identificarea heterozidelor flavonice*

0,100 g extract (exemplul 1) din fiecare șarjă (S1, S2, S3) se dizolvă în 10 mL etanol 50%. Soluțiile se concentrează la ~1mL. Substanțele de referință aplicate: kaempferol-7-neoglucozida, troxerutin, izoquercitrozidă, rutozidă, hiperozidă, vitexină.

În cele trei șarje s-au identificat:

- izoquercitrozida la valoarea $R_f = 0,68$; spectrele UV corespund;
- toate spoturile corespund între șarje (aceleași valori R_f și spectre UV/VIS)(figura 2);

- *identificarea agliconilor flavonici*

0,200 g extract (exemplul 1) din fiecare șarjă (S1, S2, S3) se suspendă în apă 10 mL bidistilată și se adaugă 10 mL HCl 2M. Amestecul se menține la fierbere timp de 30 min, apoi se extrage fracțiunea de agliconi cu eter etilic și se concentrează la 1 mL. Substanțele de referință aplicate: chrysină, miricetol, quercetol, miricetol, kaempferol, luteolin, umbeliferonă, acid cafeic, fisetină, 5-hidroxi flavonă.

În cele trei șarje s-au identificat:

- quercetolul la $R_f = 0,59$; miricetolul la $R_f = 0,49$; luteolinul la $R_f = 0,53$ și acidul cafeic la $R_f = 0,56$; spectrele UV corespund;
- toate spoturile corespund între șarje (aceleași valori R_f și spectre UV/VIS)(figura 2);

Verificarea reproductibilității procesului de obținere prin spectrometrie în IR.

Analiza IR a celor trei șarje indică o compoziție chimică similară pentru cele 3 șarje de extract demonstrată prin grupările funcționale comune, cu o regiune de amprentă caracteristică extractului.

În tabelul 1 sunt prezentate atribuirile principalelor benzi din spectrele IR înregistrate pentru cele trei șarje ale extractului de *Anthriscus sylvestris*.

Tabel 1. Principalele benzi în spectrul IR

| Extract | Exemplul 1 | | | | | |
|------------------------------|-------------------------------|------|-------------------------------|------|-------------------------------|------|
| Șarja | S1 | | S2 | | S3 | |
| Lungime de undă/transmitanță | λ [cm ⁻¹] | %T | λ [cm ⁻¹] | %T | λ [cm ⁻¹] | %T |
| | 3300 | 76,8 | 3273 | 74,7 | 3266 | 73,6 |
| | 2931 | 87,8 | 2935 | 87,7 | 2936 | 87,6 |
| | 1591 | 69,6 | 1587 | 69,5 | 1586 | 69,4 |
| | 1361 | 67,3 | 1374 | 65,1 | 1374 | 65,0 |
| | 1270 | 71,5 | 1265 | 71,1 | 1263 | 71,7 |
| | 1030 | 47,0 | 1031 | 45,2 | 1031 | 44,2 |

| | | | | | |
|-----|------|-----|------|-----|------|
| 774 | 68,0 | 771 | 67,5 | 770 | 67,6 |
| 500 | 47,1 | 518 | 46,2 | 522 | 46,6 |
| 489 | 47,3 | 490 | 47,2 | 505 | 46,9 |
| 457 | 48,1 | 473 | 46,9 | 468 | 48,3 |
| 424 | 46,5 | 422 | 47,0 | 424 | 46,6 |
| 414 | 47,0 | 415 | 46,8 | 414 | 46,8 |

Standardizarea în principii active

Analiza principiilor active antioxidante - polifenoli totali exprimați în echivalenți de acid galic s-a efectuat prin metoda spectrofotometrică cantitativă Folin Ciocalteu.

0,020 g extract (exemplul 1) din fiecare șarjă se dizolvă în 10 mL etanol 50%. Soluțiile se centrifughează la 6000 rpm (Centurion C2) și se folosește supernatantul. Volume corespunzătoare de supernatant se folosesc pentru determinarea polifenolilor totali la 750 nm conform procedurii descris în literatura de specialitate [Olaru OT și colab., *Oncol Lett.* **2015**; 10(3):1323-1332].

Extractul standardizat prezintă un conținut de 4,44 – 6,56 g polifenoli totali exprimați în echivalenți acid galic/100 g extract uscat. Rezultatele determinărilor individuale sunt prezentate în tabelul 2.

Tabel 2. Conținutul în polifenoli al extractelor

| Șarja | Șarja 1 | Șarja 2 | Șarja 3 |
|---|-------------|-------------|-------------|
| Polifenoli totali (g echivalenți acid galic/100g extract) | 5,54 | 5,06 | 5,91 |
| Intervalul de încredere 95% (g echivalenți acid galic/100g extract) | 3,49 - 7,59 | 3,20 - 6,92 | 4,56 - 7,26 |

Rezultatele determinărilor cantitative au fost analizate statistic prin aplicarea testelor ANOVA și Tukey. Nu s-au înregistrat diferențe statistice între cantitatea de polifenoli totali din cele trei șarje de extract ($p=0,4006$, $R^2=0,2628$). În urma analizei statistice s-a calculat procentul de principii active din extractul standardizat, respectiv de 4,44 – 6,56 g polifenoli totali exprimați în echivalenți acid galic/100 g extract uscat.

Evaluarea proprietăților antiinflamatoare

Pentru evaluarea *in vivo* a proprietăților antiinflamatoare a extractelor vegetale obținute din *Anthriscus sylvestris*, caracterizate și standardizate în polifenoli totali, 4,44 – 6,56 g% exprimați în acid galic, s-a utilizat metoda pletismotică de evaluare a edemului lapei de șobolan, indus cu 2 agenți inflamatori (dextran și caolin) (Olar R și colab., *JTAC*. **2017**;127(1):685-696), care după administrarea intraplantară produc inflamație prin mecanisme distincte. Edemul rezultat după administrarea intraplantară a dextranului este un edem de tip osmotic, format prin creșterea permeabilității vasculare locale sub acțiunea histamino- și serotonin- eliberatoare a dextranului (Guo SS și colab., *Chin J Integr Med*. **2017**;23(2):138-145; Bezerra AN și colab., *J Ethnopharmacol*. **2017**;202:234-240). Edemul rezultat după administrarea intraplantară a caolinului are la bază eliberarea de citokine proinflamatoare (interleukina (IL)-1 β , IL-6 și factorul de necroză tumorală (TNF) α) (Camargo LL și colab., *Neuroimmunomodulation*. **2015**;22(6):373-384)

Descrierea materialelor și a metodei de inducere a inflamației

Materiale:

Soluții și reactivi:

Soluție dextran 0,6% (Dextran 6000, Sigma(R));

Suspensie caolin 10% (Caolin, Health Chemicals Co., Ltd. (China));

Soluție uretan 13% (Uretan, Sigma(R));

Extract hidroalcoolic de *Anthriscus sylvestris* (exemplul 1).

Aparatură:

Pletismometru : Ugo Basile Plethysmometer Cat. No. 7140

Specificații ale aparatului:

Cuve cu apă: 3,5cm pentru șobolani.

Rezoluția aparatului: 0,01 mL.

Animale:

Au fost folosiți 42 de șobolani masculi, sușa Wistar, cu greutatea 193 \pm 53 g.

Animalele aduse din crescătorie au fost lăsate timp de 3 zile să se obișnuiască cu noul habitat. Hrana (grăunțe pentru șoareci și șobolani, Institutul Cantacuzino, București) a fost administrată *ad libitum*. Apa a fost administrată *ad libitum*, din biberoane.

Animalele au fost ținute în condiții de umiditate și temperatură monitorizate cu un termohigrometru. Valorile înregistrate au fost cuprinse între 35-45% pentru umiditate și 20°C-22°C pentru temperatură.

Inducerea inflamației:

S-au utilizat doi agenți de inducere a inflamației cu dextran și, respectiv, caolin, care s-au administrat intraplantar, în laba dreaptă a animalelor.

Înainte și la 1, 2, 3, 4, 5 și 24 de ore de la inducerea inflamației s-a determinat volumul labei șobolanilor, respectiv a edemului indus.

Protocolul de lucru:

42 de șobolani masculi, sușa Wistar, cu greutatea 193 ± 52 g, au fost împărțiți în 8 loturi de 7 animale, care au primit următoarele tratamente:

În primele 5 zile:

Lotul 1-dex: șobolani tratați cu apă distilată, prin gavaj, în volum de 1 mL/100g corp, p.o., x2/zi.

Lotul 2-dex: șobolani tratați cu apă distilată, prin gavaj, în volum de 1 mL/100g corp, p.o., x2/zi.

Lotul 3-dex: șobolani care au primit extract hidroalcoolic de *Anthriscus sylvestris* 1mL/100g corp, p.o, x2/zi.

Lotul 1-cao: șobolani tratați cu apă distilată, prin gavaj, în volum de 1 mL/100g corp, p.o., x2/zi.

Lotul 2-cao: șobolani tratați cu apă distilată, prin gavaj, în volum de 1 mL/100g corp, p.o., x2/zi.

Lotul 3-cao: șobolani care au primit extract hidroalcoolic de *Anthriscus sylvestris* 1mL/100g corp, p.o, x2/zi.

În ziua a 6-a, cu o oră înaintea inducerii inflamației:

Lotul 1-dex: apă distilată, prin gavaj, în volum de 1 mL/100g corp, p.o.

Lotul 2-dex: diclofenac, prin gavaj, în doză de 100 mg/kg corp, dintr-o soluție 1%, p.o.

Lotul 3-dex: extract hidroalcoolic de *Anthriscus sylvestris* 1mL/100g corp, p.o.

Lotul 1-cao: apă distilată, prin gavaj, în volum de 1 mL/100g corp, p.o.

Lotul 2-cao: diclofenac, prin gavaj, în doză de 100 mg/kg corp, dintr-o soluție 1%, p.o.

Lotul 3-cao: extract hidroalcoolic de *Anthriscus sylvestris* 1mL/100g corp, p.o.

După administrarea substanțelor, animalele au fost anesteziate cu uretan 1,3 g/kg corp, administrat i.p., sub formă de soluție apoasă de concentrație 13%.

După instalarea anesteziei generale, s-a determinat volumul inițial al labei șobolanilor.

Următorul pas al protocolului a fost inducerea inflamației labei șobolanului, prin administrarea intraplantară de 0,2 ml agent inflamator.

După administrarea agentului inflamator, s-a urmărit evoluția edemului indus la următorii timpi: 1, 2, 3, 4, 5, 24 ore.

Pentru evaluarea acțiunii antiinflamatoare a extractului hidroalcoolic de *Anthriscus sylvestris* standardizat în polifenoli totali s-a folosit ca substanță de referință diclofenacul (antiinflamator nesteroidian eficient în inflamația indusă cu dextran sau caolin (Olar R și colab., *JTAC*. 2017;127(1):685-696)).

Calculul statistic:

Rezultate sunt exprimate ca Medie \pm Deviație Standard.

Analiza statistică s-a realizat cu ajutorul programului GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Interpretarea statistică a rezultatelor s-a realizat după următorul algoritm:

1. S-a verificat dacă distribuția rezultatelor este normală (gaussiană) prin aplicarea testului Kolmogorov-Smirnov pentru verificarea normalității:

a. Dacă distribuția rezultatelor a fost normală s-a trecut la pasul 2;

b. Dacă distribuția rezultatelor nu a fost normală s-a aplicat testul de excludere a valorilor extreme prevăzut în Farmacopeea Română Ed. X (FRX) (xxx. Farmacopeea Română, ediția a X-a, Editura Medicală, București, 1993.); după realizarea excluderilor matematice s-au aplicat teste de verificare a distribuției normale a rezultatelor, testului Kolmogorov-Smirnov.

2. Pentru interpretarea statistică a setului de date rezultat în urma verificării normalității, s-au aplicat teste parametrice (t-student, ANOVA pe o cale) de evidențiere a diferențelor dintre medii.

Rezultatele testelor statistice de discriminare aplicate prezintă un interval de încredere de 90%, iar semnificația statistică a fost considerată pentru $p < 0,05$.

Evoluția procentuală a inflamației s-a calculat după formula următoare:

$$\% = \frac{V_{xh} - V_0}{V_0} \times 100$$

unde V_0 este volumul inițial al labei de șobolan, iar V_{xh} este volumul labei de șobolan la momentul determinării.

Rezultatele evaluării acțiunii antiinflamatoare a extractului hidroalcoolic de Anthriscus sylvestris

În tabele 3 și 4 sunt prezentate rezultatele determinărilor pletismometrice și interpretarea statistică a rezultatelor de valorile inițiale, înainte de administrarea agentului inflamator, pentru dextran și respectiv caolin.

Tabel 3. Rezultatele determinărilor pletismometrice și interpretarea statistică a rezultatelor de valorile inițiale, înainte de administrarea dextranului

| | V0 (mL) | V1h (mL) | V2h (mL) | V3h (mL) | V4h (mL) | V5h (mL) | V24h (mL) |
|-----------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Lot 1-dex | 1,27±0,06 | 1,97±0,21 | 2,08±0,27 | 2,13±0,25 | 2,14±0,20 | 2,18±0,18 | 1,40±0,09 |
| Test t, p | | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 |
| Lot 2-dex | 1,09±0,12 | 1,80±0,23 | 1,85±0,23 | 1,79±0,17 | 1,79±0,14 | 1,85±0,23 | 1,30±0,15 |
| Test t, p | | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 |
| Lot 3-dex | 1,07±0,06 | 1,39±0,11 | 1,56±0,16 | 1,47±0,23 | 1,52±0,16 | 1,53±0,14 | 1,22±0,12 |
| Test t, p | | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 |

Tabel 4. Rezultatele determinărilor pletismometrice și interpretarea statistică a rezultatelor de valorile inițiale, înainte de administrarea caolinului

| | V0 (mL) | V1h (mL) | V2h (mL) | V3h (mL) | V4h (mL) | V5h (mL) | V24h (mL) |
|--------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Lot 1-caolin | 1,24±0,09 | 1,65±0,05 | 1,74±0,17 | 1,77±0,09 | 1,80±0,17 | 1,84±0,12 | 1,94±0,18 |
| Test t, p | | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 |

| | | | | | | | |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Lot 2-cao | 1,13±0,17 | 1,39±0,13 | 1,46±0,11 | 1,47±0,14 | 1,59±0,14 | 1,65±0,17 | 1,80±0,26 |
| Test t, p | | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 |
| Lot 3-cao | 1,08±0,05 | 1,32±0,13 | 1,31±0,13 | 1,31±0,12 | 1,36±0,11 | 1,37±0,13 | 1,64±0,23 |
| Test t, p | | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 |

Pe tot parcursul experimentului volumul edemului indus nu revenit la valorile bazale.

Evoluția comparativă a procesului inflamator este redată in figura 3 A și B.

Procesele globale inflamatorii au diferit (ANOVA, $p < 0,05$) indicând mecanisme diferite de acțiune pentru substanțele testate față de lotul martor.

În urma analizei statistice a evoluției % comparative pentru celor două procese inflamatorii se constată efect antiinflamator pentru loturile de animale care au primit extractul standardizat de *Anthriscus sylvestris*, pe toată durata experimentului. Semnificație statistică fiind întâlnită:

- dextran
 - 1, 3, 4 și 5 ore (test t, $p < 0,05$) față de lotul martor tratat cu apă distilată
 - 1, 2, 3, 4 și 5 ore (test t, $p < 0,05$) față de lotul de referință tratat cu diclofenac
- caolin
 - 2, 3, 4 și 5 ore (test t, $p < 0,05$) față de lotul martor tratat cu apă distilată
 - 2, 3 și 5 ore (test t, $p < 0,05$) față de lotul de referință tratat cu diclofenac

Acțiunea antiinflamatoare a extractului hidroalcoolic de *Anthriscus sylvestris* se bazează pe conținutul crescut de polifenoli care interferează cu procesele de permeabilitate vasculară și de generare a citokinelor prionflamatoare (Guo SS și colab., Chin J Integr Med. 2017;23(2):138-145; Bezerra AN și colab., J Ethnopharmacol. 2017; 202: 234-240; Camargo LL și colab., Neuroimmunomodulation. 2015; 22(6): 373-384.; Jajtner AR, și colab., Physiol Rep. 2016;4(24). pii: e13058; Zeinali M și colab., Biomed Pharmacother. 2017;92:998-1009; Mukherjee A și colab., J Pharmacopuncture. 2015; 18(1): 19–26; Mkhize NVP și colab., J Exp Neurosci. 2017;11: 1179069517704668; Qin HD și colab., Int Immunopharmacol. 2010; 10(9): 1135-11341; Shishehbor F și colab., Iran J Allergy Asthma Immunol. 2010; 9(1):27-34.)

REVENDICĂRI

1. Extracte vegetale obținute din *Anthriscus sylvestris* și standardizate în polifenoli totali caracterizate prin aceea că acestea conțin izoquercitrozidă, quercetol, miricetol, luteolin, acid cafeic și cuprind 4,44 – 6,56 g% polifenoli totali exprimați în acid galic.

2. Procedul de obținere pentru extractele din *Anthriscus sylvestris* care cuprinde următoarele etape:

- obținerea și caracterizarea materiei prime (produsul vegetal);
- extracția principiilor active: extracția la rece într-un agitator reciprocant la temperatura camerei cu agitare intermitentă timp de 6...24 h și extracția prin metoda Soxhlet timp de 6 h cu amestec de alcool etilic și apă în diverse proporții sau alcool etilic absolut la un raport material vegetal:solvent 1:10...1:12,5;
- concentrarea soluțiilor extractive la evaporator rotativ, la temperatură scăzută (40°C);
- uscarea extractelor prin liofilizare.

3. Extractele vegetale obținute conform revendicărilor 1 și 2 pentru utilizare ca adjuvant în terapia afecțiunilor inflamatorii.

Fig. 1. Amprenta IR a extractului standardizat de *Anthriscus sylvestris* pe domeniul 400-4000 cm^{-1} (S1- roșu, S2- verde, S3- albastru)

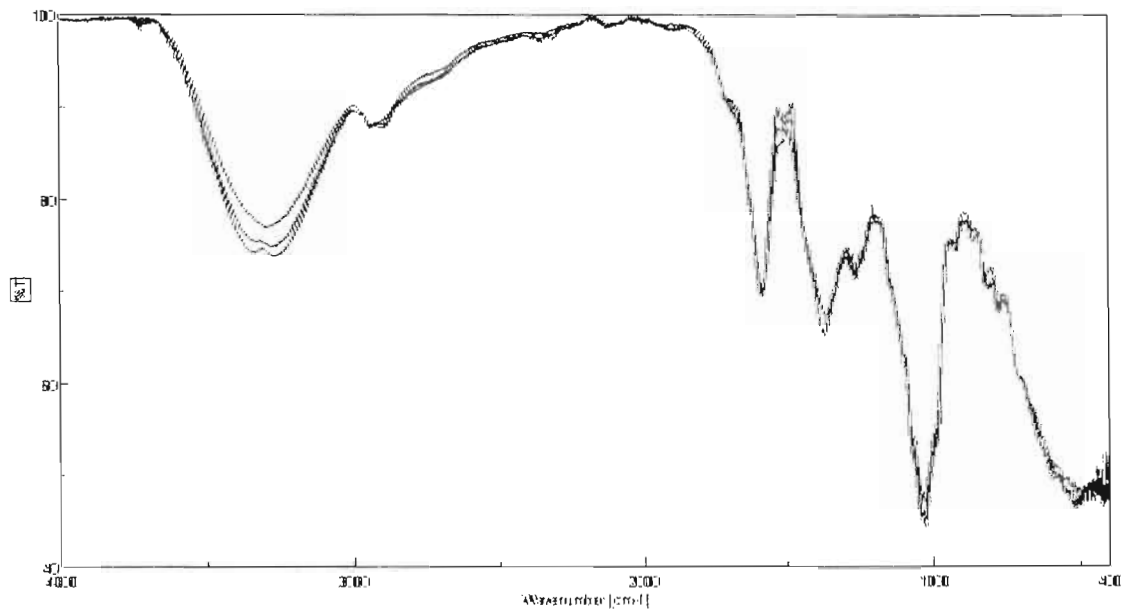


Fig. 2. Amprenta TLC (cromatogramele în UV la $\lambda=366\text{nm}$ și densitogramele la $\lambda=254\text{nm}$) a celor trei șarje de extract standardizat de *Anthriscus sylvestris*: A. identificarea heterozidelor; B. identificarea agliconilor flavonici.

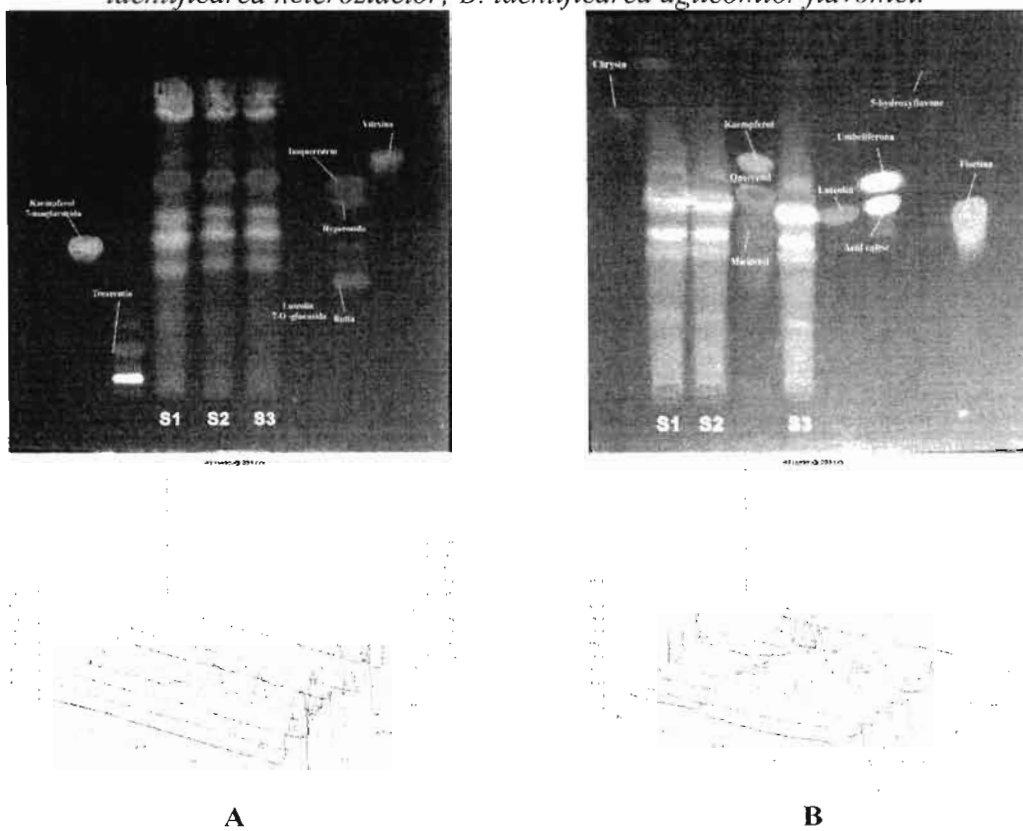


Fig. 3. Efectul extractului hidroalcoolic de *Anthriscus sylvestris* asupra inflamației generate de dextran (A) și de caolin (B) comparativ cu lotul tratat cu diclofenac: 1 - lotul tratat cu apă; 2 - lotul tratat cu diclofenac; 3 - lotul tratat cu extract hidroalcoolic de *Anthriscus sylvestris*.

