



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 00312**

(22) Data de depozit: **07/05/2018**

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

(41) Data publicării cererii:  
**30/04/2019** BOPI nr. **4/2019**

(73) Titular:  
• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI  
FARMACIE "CAROL DAVILA"**  
**BUCUREȘTI, STR.DIONISIE LUPU, NR.37,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **OLARU TUDOREL OCTAVIAN,**  
**STR.ZBOINA NEAGRĂ NR.5, BL.98, AP.8,**  
**SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **NIȚULESCU GEORGE MIHAI,**  
**ȘOS.OLTENIȚEI NR.40-44, BL.6A, SC.4,**  
**ET.7, AP.145, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,**  
**RO;**  
• **MARGINĂ DENISA MARILENA,**  
**STR.ALEXANDRU MORUZZI, NR.3,**  
**BL.A 11, SC.2, ET.2, AP.48, SECTOR 3,**  
**BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **VELESCU BRUNO ȘTEFAN,**  
**STR.NEAGOE VODĂ NR.53, BACĂU, BC,**  
**RO;**  
• **ȘEREMET OANA CRISTINA,**  
**CALEA GIULEȘTI, NR.43, BL.14A, SC.1,**  
**ET.6, AP.23, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,**  
**RO;**  
• **NIȚULESCU GEORGIANA,**  
**ȘOS.OLTENIȚEI, NR.40-44, BL.6A, SC.4,**  
**ET.7, AP.145, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,**  
**RO;**  
• **DINU PÂRVU CRISTINA ELENA,**  
**STR. GH.LAZĂR, NR.10, ET.1, SECTOR 1,**  
**BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **DINU MIHAELA, STR. ȘOIMĂREȘTILO**  
**NR. 19, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **ANCUCEANU ROBERT VIOREL,**  
**STR.MOȚOC NR.2, BL.P3, SC.3, ET.4,**  
**AP.72, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **GUȚU CLAUDIA MARIA,**  
**STR.PREVEDERII, NR.15, BL, A 12, SC.A,**  
**ET.9, AP.38, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,**  
**RO;**  
• **BĂRBUCEANU ȘTEFANIA-FELICIA,**  
**STR.AGRICULTORI, NR.44, BL.1, ET.4,**  
**AP.14, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**OLARU O. T., NIȚULESCU G. M.,**  
**TOMULESCU O. M., ENACHE I. M.,**  
**VELESCU B. S., MARGINĂ D., "CHEMICAL**  
**ANALYSIS OF SOME NEW EXTRACTS**  
**OBTAINED FROM CYMBALARIA MURALIS**  
**(PLANTAGINACEAE)", INTERNATIONAL**  
**SYMPOSIUM: PRIORITIES OF CHEMISTRY**  
**FOR A SUITABLE DEVELOPMENT -**  
**PRIOCHEM, ISSN: 2285-8334, VOLUM DE**  
**REZUMATE, P. 35, BUCUREȘTI, 2015;**  
**VELESCU B. S., ȘEREMET O. C.,**  
**NIȚULESCU G. M., MARGINĂ D., OLARU O.**  
**T., "PHARMACOLOGICAL RESEARCH**  
**REGARDING THE ANTIINFLAMMATORY**  
**EFFECT OF SOME EXTRACTS OBTAINED**  
**FROM PLANTAGINACEAE FAMILY",**  
**INTERNATIONAL SYMPOSIUM:**  
**PRIORITIES OF CHEMISTRY FOR A**  
**SUITABLE DEVELOPMENT - PRIOCHEM,**  
**ISSN: 2285-8334, P. 61, BUCUREȘTI, 2016;**  
**ARMANDODORIANO B., MARCELLA G.,**  
**GIOVANA P., MARCELLO N., MAURIO S.,**  
**"MURALIOSIDE, AN IRIDOID FROM**  
**CYMBALARIA MURALIS",**  
**PHYTOCHEMISTRY, VOL. 44(8),**  
**PP. 1515-1517, 1997**

(54) **EXTRACTE CU ACȚIUNE ANTIINFLAMATOARE  
DIN CYMBALARIA MURALIS, ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE**



Prezenta invenție se referă la extracte naturale obținute din specia *Cymbalaria muralis*, G.Gaertn., B.Mey. & Scherb., caracterizate calitativ și cantitativ, la procedeul de obținere și la proprietățile antioxidante și antiinflamatoare cu utilizare terapeutică.

Compușii polifenolici prezintă un interes deosebit datorită numeroaselor acțiuni farmacologice, printre care, proprietățile antioxidante și antiinflamatoare (Yeh și colab., **Journal of food and drug analysis**, 2017, 25(1), 84-92; De Beer și colab., **South African Journal of Enology and Viticulture**, 2017, 23(2), 48-61; Oliviero și colab., **Anti-inflammatory effects of polyphenols in arthritis. Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2018, 98(5), 1653-1659). Speciile vegetale constituie surse bogate, complexe, de multe ori neexplorate de constituenți cu potențial antioxidant și antiinflamator.

*Cymbalaria muralis*, G.Gaertn., B.Mey. & Scherb. (*Plantaginaceae*) este o plantă sălbatică răspândită în regiunile temperate din Emisfera Nordică. Planta reprezintă o resursă ieftină și cu o disponibilitate bună și este puțin utilizată în medicina tradițională pentru acțiunea antiinflamatoare, analgezică și sedativă (Gastaldo, **Compendio della Flora Officinale Italiana**. Piccin V., Padova, Italia, 1987, p. 358). Cercetări anterioare cu privire la compoziția chimică calitativă a speciei au evidențiat prezența iridoidelor antirrhinozida, linariozida și muraliozida (Kapoor și colab. **Phytochemistry**, 1974, 13(6), 1018-1019; Bianco și colab., **Phytochemistry**, 1997, 44(8), 1515-1517), precum și a flavonoidelor 7-glucozidate și 7-glucuronidele apigenolului, luteolinului și chrisoeriolului (Romussi și colab. **Phytother. Res**, 1996, 10, S84-S85). Iridoidele, precum și agliconul flavonic luteolin, prezintă acțiune antiinflamatoare demonstrată la animalele de laborator (Ghisalberti, **Phytomedicine**, 1998, 5(2), 147-163; Dinda și colab., **Chem pharm bulletin**, 2007, 55(2), 159-222; Dinda și colab., **Chem pharm bulletin**, 2007, 55(5), 689-728; Ziyen și colab., **Planta medica**, 2007, 73(03), 221-226. Seelinger și colab., **Planta medica**, 2008, 74(14), 1667-1677). Astfel, *Cymbalaria muralis* reprezintă o soluție optimă pentru prepararea unor produse de uz topic cu acțiune antioxidantă și antiinflamatoare, extractele obținute în prezenta cerere de brevet prin procedeele descrise nefiind menționate în literatură.

Invenția de față se referă la obținerea de extracte vegetale din specia *Cymbalaria muralis* și la evaluarea proprietăților antioxidante și antiinflamatoare în vederea utilizării în terapie.

Obiectul invenției constă într-un procedeu de obținere a extractelor vegetale de *Cymbalaria muralis* caracterizate calitativ și cantitativ, la verificarea reproductibilității procesului și evaluarea capacității antioxidante in vitro și de scădere a inflamației la modelul experimental pe șobolan.

Extractele conform invenției sunt reprezentate de extracte vegetale liofilizate, cu un conținut de polifenoli totali exprimați în acid galic de 2,54 - 4,38 g% și un conținut de flavonozide totale exprimate în quercetol de 0,39 - 0,69 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 1:5...1:10, urmată de concentrarea la evaporator rotativ la 40 - 50°C și uscarea prin liofilizare. Extracția la rece se realizează în flacoane de sticlă cu ajutorul unui mixer la temperatura camerei cu agitare intermitentă timp de 6 h și urmată de un repaus de 2 zile. Extracția la cald se realizează la un aparat Soxhlet timp de 48 h sau la reflux într-o instalație de refluxare cu refrigerent ascendent timp de 60 min.

Pentru caracterizarea calitativă a extractelor și verificarea reproductibilității procesului de obținere s-au efectuat amprentele extractelor liofilizate 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:	1
- valorificarea speciei vegetale <i>Cymbalaria muralis</i> ;	
- obținerea extractelor vegetale se face utilizând solvenți netoxici pentru om și nepoluauți;	3
- extractele vegetale sunt obținute printr-un procedeu cu un randament bun de extracție a principiilor active;	5
- extractele obținute prezintă proprietăți antioxidante și antiinflamatoare.	7
Descrierea pe scurt a desenelor:	
- fig. 1, prezintă evoluția procentuală față de inițial a procesului inflamator pentru lotul martor (1-dex), lotul diclofenac (2-dex), lotul care a primit extract apos de <i>Cymbalaria muralis</i> (3-dex) și lotul care a primit extract hidroalcoolic de <i>Cymbalaria muralis</i> (4-dex) în modelul de inducere a inflamației cu dextran;	9
- fig. 2, prezintă evoluția procentuală față de inițial a procesului inflamator pentru lotul martor (1-ca), lotul diclofenac (2-ca), lotul care a primit extract apos de <i>Cymbalaria muralis</i> (3-ca) și lotul care a primit extract hidroalcoolic de <i>Cymbalaria muralis</i> (4-ca) în modelul de inducere a inflamației cu caolin.	13
În continuare invenția este ilustrată prin două exemple nelimitative de realizare.	15
<b>Exemplul 1</b>	17
Descrierea etapelor de obținere a extractului apos de <i>Cymbalaria muralis</i> :	19
<i>Etapă I. Prelucrarea materiei prime (produsul vegetal)</i>	
Materialul vegetal constituit din partea aeriană cu rădăcini adventive a plantei recoltată în timpul înfloririi și fructificării se supune sortării, uscării la umbră la temperatura camerei și apoi unei noi sortări. 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. Uscarea se continuă la etuvă până la o umiditate de maximum 10%. 50 g produs vegetal se cântăresc, se mărunțesc și se trec prin sita de 2 mm.	21
<i>Etapă II. Extracția principiilor active</i>	23
Produsul vegetal se aduce într-un balon cu fund rotund și se umectează cu aproximativ 50 mL apă bidistilată. În balon se adaugă 500 mL apă bidistilată peste produsul vegetal umectat și se montează la o instalație prevăzută cu refrigerent ascendent. Se refluxează timp de 60 min. După refluxare, soluția extractivă se filtrează la presiune normală și apoi la presiune redusă. Procedul de refluxare se repetă de 2 ori.	25
<i>Etapă III. Concentrarea soluției extractive</i>	27
Concentrarea s-a efectuat la un evaporator rotativ Ingos RVO 004, sub vid, la temperatură de 50°C, până la obținerea unei suspensii apoase cu un volum de aproximativ 1/10 ori mai mic decât volumul inițial.	29
<i>Etapă IV. Uscarea prin liofilizare a suspensiei apoase concentrate</i>	31
Uscarea soluției extractive concentrată a fost relizată prin liofilizarea acesteia la un aparat ScanVac Coolsafe, la o temperatură de liofilizare de -55°C timp de 48 h.	33
Randamentul de obținere a extractului liofilizat a fost de 22,34% cu un conținut de 0,46-0,59 g% flavonozide totale exprimate în quercetol și 3,88-4,38 g% polifenoli totali exprimați în acid galic.	35
<i>Etapă V. Condiționarea extractelor uscate</i>	37
Extractul obținut a fost condiționat în flacoane din sticlă brună cu dop din PVC, bine închisă, la întuneric și conservat la temperatura camerei.	39
<b>Exemplul 2</b>	43
Descrierea etapelor de obținere a extractului hidroalcoolic de <i>Cymbalaria muralis</i> :	45
<i>Etapă I. Prelucrarea materiei prime (produsul vegetal)</i>	
Materialul vegetal constituit din partea aeriană cu rădăcini adventive a plantei recoltată în timpul înfloririi și fructificării se supune sortării, uscării la umbră la temperatura camerei și apoi unei noi sortări. Materia rezultată denumită în continuare produs vegetal,	47

conține mai puțin de 0,5% impurități provenite din alte specii vegetale și mai puțin de 1,5% impurități provenite din aceeași plantă. Uscarea se continuă la etuvă până la o umiditate de maximum 10%. 50 g produs vegetal se cântăresc, se mărunțesc și se trec prin sita de 2 mm.

## *Etapă II. Extracția principiilor active*

Produsul vegetal se aduce într-un balon cu fund rotund și se umețează cu aproximativ 50 mL alcool etilic 50% (v/v). În balon se adaugă 500 mL alcool etilic 50% (v/v) peste produsul vegetal umețat și se montează la o instalație prevăzută cu refrigerent ascendent.

Se refluxează timp de 60 min. După refluxare, soluția extractivă se filtrează la presiune normală și apoi la presiune redusă. Procedul de refluxare se repetă de 2 ori.

## *Etapă 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.

## *Etapă 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 liofilizat a fost de 26,06% cu un conținut de 0,39-0,51 g% flavonozide totale exprimate în quercetol și 3,06-3,66 g% polifenoli totali exprimați în acid galic.

## *Etapă V. Condiționarea extractelor uscate*

Extractul obținut a fost condiționat în flacoane din sticlă brună cu dop din PVC, bine închisă, 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 silicagel depus pe aluminiu Merck F60 254; faza mobilă utilizată 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.

0,200 g extract (exemplul 1, 2) din fiecare șarjă se suspendă în 10 mL apă 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: chrisină, miricetol, quercetol, kaempferol, luteolin, apigenol, umbeliferonă, acid cafeic, fisetină, 5-hidroxi flavonă. În cele trei șarje s-au identificat:

- luteolin ( $R_f = 0,55$ ) și apigenol ( $R_f = 0,72$ ); spectrele UV corespund;
- toate spoturile corespund între șarje (aceleași valori  $R_f$  și spectre UV/VIS);

## *Verificarea reproductibilității procesului de obținere prin spectrometrie în IR*

Spectrele IR s-au achiziționat în fază solidă folosind un spectrofotometru JASCO FT71R-4200 prevăzut cu un accesoriu ATR PRO450-S cu optică de diamant, lucrând în tehnica de reflexie totală atenuată (ATR) în intervalul spectral de 400÷4000  $\text{cm}^{-1}$ , la o rezoluție de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Analiza IR a șarjelor extractelor indică o compoziție chimică similară pentru 3 șarje de extract demonstrată prin grupările funcționale comune, cu o regiune de amprentă caracteristică extractului.

## *Standardizarea în principii active*

Analiza principiilor active antioxidante - flavonozide totale exprimate în g de quercetol s-a efectuat prin metoda spectrofotometrică cantitativă cu  $\text{AlCl}_3$  și polifenoli totali exprimați în g de acid galic s-a efectuat prin metoda spectrofotometrică cantitativă Folin Ciocâlteu.

0,020 g extract (exemplul 1, 2) din fiecare șarjă se dizolvă în 10 mL etanol 96%. Soluțiile se centrifughează la 6000 rpm (Centurion C2) și se folosește supernatantul. Volume corespunzătoare de supernatant se folosesc pentru determinarea flavonozidelor totale la 430 nm conform procedului descris în literatura de specialitate (Olaru OT și colab., Oncol Lett. 2015; 10(3): 1323-1332).

0,020 g extract (exemplul 1, 2) din fiecare șarjă se dizolvă în 10 mL etanol 96%. 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 apos (exemplul 1) prezintă un conținut de 0,46-0,59 g% flavonozide totale exprimate în quercetol și 3,88-4,38 g% polifenoli totali exprimați în acid galic și extractul standardizat hidroalcoolic (exemplul 2) prezintă un conținut de 0,39-0,51 g% flavonozide totale exprimate în quercetol și 3,06-3,66 g% polifenoli totali exprimați în acid galic.

## *Evaluarea proprietăților antioxidante*

S-a folosit metoda cu difenil-1-pirenilfosfina (DPPP) utilizând un model de lipozomi unilamelari DMPC+Chol (**Margina și colab., Gen. Physiol. Biophys, 2012 31(1), 47-55**). Lipozomii DMPC+Chol au fost preparați prin metoda sonicării, filmul lipidic fiind constituit din fosfatidilcolină (PC) și colesterol (Chol). Au fost obținute două tipuri de lipozomi - lipozomi cu fosfatidilcolină și lipozomi cu fosfatidilcolină și 33% colesterol. Ulterior, lipozomii au fost incubati timp de 10 min cu extractele vegetale în concentrații corespunzătoare a 5 μM, 10 μM și respectiv 20 μM acid galic. A urmat incubarea în raport de 1:1000 cu DPPP, sonda ce interacționează cu lipidele, și care în prezența hidroperoxizilor lipidici (în acest caz, peroxid de cumen) se oxidează cu formare de DPPP-oxid - substanță fluorescentă.

Evaluarea s-a făcut prin înregistrarea în cinetică a spectrelor de emisie fluorescentă între 360 nm și 410 nm, X excitație = 351 nm (spectrofluorimetru Perkin Elmer LS50B) comparativ cu standardul pozitiv acid galic în concentrații de 5 μM, 10 μM și respectiv 20 μM.

Rezultatele sunt înscrise în tabelul 1 și dovedesc proprietățile antioxidante ale extractelor. Astfel, cel mai puternic efect antioxidant a fost înregistrat la extractul în alcool etilic 50%.

## *Proprietățile antioxidante ale extractelor asupra peroxidării lipozomale*

*Tabelul 1*

Nr. crt.	Proba	Concentrație (μM/mL)	Peroxidare lipozomală					
			60s	120s	180s	240s	300 s	% Peroxidare
1	Lipozomi DMPC+Chol		44,04	81,58	117,96	148,77	175,38	298,22
2	Acid galic	5 μM	106,91	121,19	143,36	166	186,21	74,17
		10 μM	77,25	104,02	130,84	153,85	172,77	123,65
		20 μM	55,93	99,51	133,3	158,73	181,49	224,49
3	Exemplul 1	4 μM	124,79	134,62	151,06	166,94	181,34	45,31
		10 μM	98,92	122,9	147,45	171,18	190,34	92,41
		20 μM	84,97	127,53	167,29	199,28	226,74	166,84
4	Exemplul 2	4 μM	104,53	116,82	128,86	137,59	144,14	37,89
		10 μM	107,85	119,14	131,59	142,02	149,38	38,50
		20 μM	142,94	165,88	189,19	208,9	225,63	57,84

## Evaluarea proprietăților antiinflamatoare

Pentru evaluarea proprietăților antiinflamatoare a extractelor uscate obținute din partea aeriană de *Cymbalaria muralis*, s-a utilizat metoda pletismoterică de evaluare a edemului labei de șobolan, indus cu 2 agenți inflamatori (dextran și caolin) (Olar R et. al, JTAC 2017, 127(1):685-696). Aceștia produc inflamație după administrare intraplantară prin mecanisme distincte. Dextranul produce un edem de tip osmotic, format prin creșterea permeabilității vasculare locale sub acțiunea histaminei și a serotoninei (Bezerra și colab., J Ethnopharmacol. 2017, 202:234-240), iar caolinului crește kininele și în special bradikina (Kumakura și colab., J Pharmacol Exp Ther, 1987, 243(3): 1067-1073).

### Materiale și metodă

#### Soluții și reactivi:

- soluție dextran 0,6% (Dextran 6000, Sigma Aldrich, Germania);
- suspensie caolin 10% (Caolin, Health Chemicals Co., Ltd. (China));
- soluție uretan 13% (Uretan, Sigma Aldrich, Germania);
- extract apos uscat de *Cymbalaria muralis* (exemplul 1);
- extract hidroalcoolic uscat de *Cymbalaria muralis* (exemplul 2);
- soluție apoasă diclofenac 1% (Diclofenac Sodic, Sigma Aldrich, Germania).

#### Aparatură:

- Pletismometru: Ugo Basile Plethysmometer Cat. No. 7140. Specificații ale aparatului: cuve cu apă: 3,5 cm pentru șobolani. Rezoluția aparatului: 0,01 mL.

Animale: Pentru experiment au fost folosiți 56 de șobolani masculi, sușa Wistar, cu greutatea  $324 \pm 20$  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 la post alimentar 4 h înainte de administrarea tratamentelor. 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 20-22°C pentru temperatură. Experimentul s-a desfășurat în conformitate cu normele bioetice în vigoare.

#### Protocolul de lucru:

Animalele au fost împărțite în 8 loturi a câte 7 animale, care au primit următoarele tratamente:

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

Lotul 2-dex: diclofenac, 100 mg/kg, soluție 1%, p.o.

Lotul 3-dex: extract uscat apos de *Cymbalaria muralis* (exemplul 1), 100 mg/kg corp, suspensie 1%, p.o.

Lotul 4-dex: extract uscat hidroalcoolic de *Cymbalaria muralis* (exemplul 2), 100 mg/kg corp, suspensie 1%, p.o.

Lotul 1-caol: apă distilată, prin gavaj, 1 mL/100 g corp, p.o.

Lotul 2-caol: diclofenac, 100 mg/kg, soluție 1%, p.o.

Lotul 3-caol: extract uscat apos de *Cymbalaria muralis* (exemplul 1), 100 mg/kg corp, suspensie 1%, p.o.

Lotul 4-caol: extract uscat hidroalcoolic de *Cymbalaria muralis* (exemplul 2), 100 mg/kg corp, suspensie 1%, p.o.

După administrarea substanțelor animalele au fost anesteziate cu uretan 1,3 g/kg corp, administrat i.p.

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

Inflamația a fost indusă, prin administrarea intraplanară de 0,2 mL agent inflamator, după cum urmează:	1
- dextran pentru loturile 1-4 dex (0,2 mL dextran sol. 0,6%);	3
- caolin pentru loturile 1-4 cao (0,2 mL caolin susp. 10%).	
După administrarea agentului inflamator s-a urmărit evoluția edemului la 1, 2, 3, 4, și 5 h.	5
Calculul statistic: Rezultate sunt exprimate ca Medie $\pm$ Deviație Standard ( $M \pm DS$ ).	7
Calculul statistic s-a realizat utilizând programele Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp., SUA) și GraphPad Prism v. 5.0. (GraphPad Software, SUA). Stabilirea normalității s-a făcut utilizând testul Kolmogorov-Smirnov:	9
- dacă distribuția rezultatelor a fost normală s-a trecut la pasul următor;	11
- dacă distribuția rezultatelor nu a fost normală s-a aplicat testul de excludere al valorilor extreme prevăzut de Farmacopeea Română Ed. X (FRX). După realizarea excluderilor matematice s-a repetat verificarea distribuției normale cu ajutorul, testului Kolmogorov-Smirnov.	13
Pentru interpretarea statistică a setului de date rezultat în urma verificării normalității, s-au aplicat teste parametrice: t-student, pentru comparațiile față de inițial și ANOVA pentru comparațiile față de lotul martor și cel de referință. Rezultatele testelor statistice de discriminare aplicate prezintă un interval de încredere de 90%.	15
Evoluția inflamației s-a calculat procentual (%) conform literaturii.	17
Rezultate	19
În tabele 1 și 2 sunt prezentate rezultatele determinărilor pletismometrice și interpretarea statistică a rezultatelor de valorile inițiale, înainte de administrarea agentului inflamator, pentru dextran și respectiv caolin.	21

## Rezultatele determinărilor pletismometrice și interpretarea statistică a rezultatelor de valorile inițiale, înainte de administrarea dextranului

Tabelul 2

	V0 (mL)	V 1 h (mL)	V 2 h (mL)	V 3 h (mL)	V 4 h (mL)	V 5 h (mL)	
Lot 1-dex	1,27 $\pm$ 0,06	1,79 $\pm$ 0,14	1,77 $\pm$ 0,15	1,81 $\pm$ 0,15	1,87 $\pm$ 0,14	1,76 $\pm$ 0,15	29
Test t, p		p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	31
Lot 2-dex	1,28 $\pm$ 0,07	1,78 $\pm$ 0,13	1,79 $\pm$ 0,17	1,80 $\pm$ 0,16	1,80 $\pm$ 0,13	1,86 $\pm$ 0,17	
Test t, p		p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	33
Lot 3-dex	1,25 $\pm$ 0,06	1,64 $\pm$ 0,15	1,64 $\pm$ 0,15	1,67 $\pm$ 0,15	1,71 $\pm$ 0,19	1,72 $\pm$ 0,17	
Test t, p		p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	35

## Rezultatele determinărilor pletismometrice și interpretarea statistică a rezultatelor de valorile inițiale, înainte de administrarea caolinului

Tabelul 3

	V 0 (mL)	V 1 h (mL)	V 2 h (mL)	V 3 h (mL)	V 4 h (mL)	V 5 h (mL)	
Lot 1-caolin	1,22 $\pm$ 0,11	1,63 $\pm$ 0,08	1,65 $\pm$ 0,15	1,67 $\pm$ 0,11	1,72 $\pm$ 0,09	1,67 $\pm$ 0,18	41
Test t, p		p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	
Lot 2-caolin	1,23 $\pm$ 0,08	1,55 $\pm$ 0,07	1,54 $\pm$ 0,10	1,53 $\pm$ 0,17	1,55 $\pm$ 0,16	1,67 $\pm$ 0,18	43
Test t, p		p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	
Lot 3-caolin	1,26 $\pm$ 0,10	1,47 $\pm$ 0,11	1,46 $\pm$ 0,10	1,49 $\pm$ 0,12	1,59 $\pm$ 0,11	1,60 $\pm$ 0,14	45
Test t, p		p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	

1 Evoluția comparativă a procesului inflamator este redată în fig. 1, pentru dextran,  
respectiv și 2 pentru caolin.

3 Rezultatele experimentale au evidențiat:

5 - administrarea agenților inflamatori a produs creșterea în volum a labei de șobolan  
pentru toate loturile luate în lucru, la 5 h după administrarea acestora, volumul labelor de  
șobolan nerevenind la valorile inițiale;

7 - toate rezultatele obținute au avut o distribuție Gaussiană normală conform testului  
D'Agostino & Pearson, după excluderile făcute conform FRX;

9 - pentru toate loturile luate în lucru, creșterile procentuale ale volumului labei de  
șobolan au fost semnificative statistic, atunci când au fost comparate cu volumul inițial (test  
11 t,  $p < 0,05$ );

13 - substanța de referință, diclofenac, a redus edemul labei indus atât de dextran cât  
și de caolin, comparativ cu lotul martor (ANOVA,  $p < 0,05$ );

15 - în modelul de inflamație indus de dextran, extractul apos prezintă efect antiinfla-  
mator atunci când este comparat cu lotul martor și lotul de referință (ANOVA,  $p < 0,05$ );

17 - în modelul de inflamație indus de caolin, ambele extracte prezintă efect antiinfla-  
mator comparativ cu lotul martor (ANOVA,  $p < 0,05$ ), efectul fiind mai mare decât lotul de  
referință doar pentru extractul apos (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

19 În concluzie, ambele extracte, apos și hidroetanolic de *Cymbalaria muralis* (100  
mg/kgc) prezintă proprietăți antiinflamatoare, după administrarea orală, la șobolan. Pentru  
21 extractul apos efectul este mai mare decât cel observat pentru substanța de referință,  
diclofenac (100 mg/kgc).



	1
1. Extracte vegetale obținute din <i>Cymbalaria muralis</i> și standardizate în fiavonoide totale și polifenoli totali, <b>caracterizate prin aceea că</b> , acestea conțin luteolină și apigenol și cuprind 2,54-4,38 g% polifenoli totali exprimați în acid galic și 0,39-0,69 g% flavonozide totale exprimate în quercetol.	3
2. Procedeu de obținere a extracteleor din <i>Cymbalaria muralis</i> definite în revendicarea 1, care cuprinde următoarele etape:	5
- obținerea și caracterizarea materiei prime (produsul vegetal);	7
- extracția principiilor active: extracția la rece cu agitare intermitentă timp de 6 h urmată de un repaus de 2 zile la temperatura camerei și extracția la cald prin metoda Soxhlet timp de 48 h sau la reflux timp de 60 min cu amestec de alcool etilic și apă în diverse proporții sau alcool etilic absolut la un raport material vegetal: solvent 1:5...1:10;	9
- concentrarea soluțiilor extractive la evaporator rotativ, la temperatură scăzută (40-50°C);	11
- uscarea extractelor prin liofilizare.	13
3. Extracte vegetale obținute conform revendicării 1 pentru utilizare ca adjuvant în terapia afecțiunilor inflamatorii.	15
	17

(51) Int.Cl.

**A61K 36/68** (2006.01),

**A61P 29/00** (2006.01)

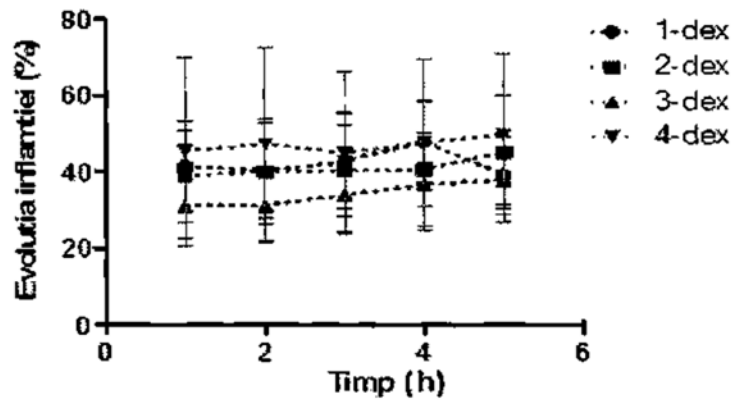


Fig. 1

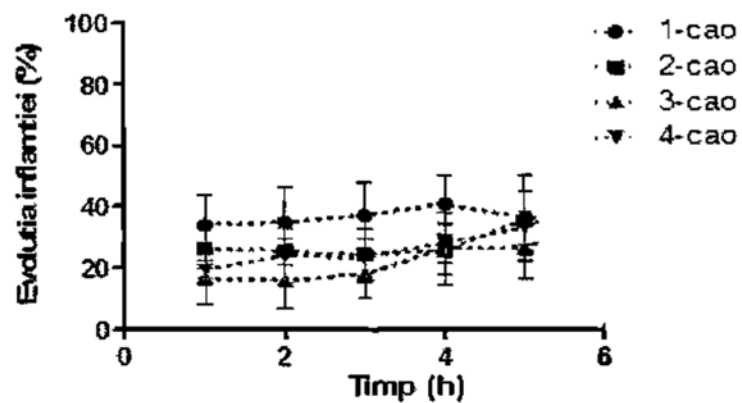


Fig. 2



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
 sub comanda nr. 408/2021