

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
INSTITUȚIA PUBLICĂ
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”

Cu titlu de manuscris
C.Z.U.: 615.2 615.322 615.453.6

CIOBANU CRISTINA

SPECIA *CYNARA SCOLYMUS* L. –
SURSĂ DE NOI PRODUSE FARMACEUTICE

316.01 - FARMACIE

Autoreferatul tezei de doctor în științe farmaceutice

CHIȘINĂU, 2015

Teza a fost elaborată în cadrul Catedrei de tehnologie a medicamentelor a IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova.

Conducător științific:

DIUG Eugen - doctor habilitat în științe farmaceutice, profesor universitar, IP USMF „Nicolae Testemițanu”.

Consultant științific:

CALALB Tatiana - doctor habilitat în științe biologice, conferențiar universitar, IP USMF „Nicolae Testemițanu”.

Referenți oficiali:

SAFTA Vladimir - doctor habilitat în științe farmaceutice, profesor universitar, IP USMF „Nicolae Testemițanu”;

CIURBA Adriana - doctor în științe farmaceutice, profesor universitar, director al Departamentului de Științe Farmaceutice de Specialitate, șef de disciplină tehnologie farmaceutică, Universitatea de Medicină și Farmacie din Târgu Mureș, România.

Componenta Consiliului științific specializat:

VALICA Vladimir - **președinte**, doctor habilitat în științe farmaceutice, profesor universitar, IP USMF „Nicolae Testemițanu”;

NISTREANU Anatolie - **secretar**, doctor în științe farmaceutice, profesor universitar, IP USMF „Nicolae Testemițanu”;

REMIȘ Vladimir - doctor habilitat în științe farmaceutice, conferențiar cercetător, Centrul de Patobiologie și Patologie al Academiei de Științe din RM;

LUPU Mihail - doctor în științe farmaceutice, conferențiar universitar, vicedirector al Agenției Medicamentului și Dispozitivelor Medicale a Ministerului Sănătății din RM;

OROIAN Silvia - doctor în științe biologice, profesor universitar, șef de disciplină Botanică Farmaceutică și Biologie Celulară, Universitatea de Medicină și Farmacie din Târgu Mureș, România.

FLOREA Vasile - doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al Academiei de Științe a Moldovei.

Susținerea va avea loc pe 10 iulie 2015, ora 14.00 în ședința Consiliului Științific Specializat DH 50 316.01-02 din cadrul Instituției Publice, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova, str. Malina Mică 66, aula 9, mun. Chișinău, 2025, Republica Moldova.

Teza de doctor și autoreferatul pot fi consultate la biblioteca IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (MD 2004, mun. Chișinău, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165) și la pagina WEB a C.N.A.A. (www.cnaa.md).

Autoreferatul a fost expediat pe 09 iunie 2015.

Secretar științific al Consiliului Științific Specializat:

NISTREANU Anatolie, dr. șt. farm., prof. univ. _____

Conducător științific:

DIUG Eugen, dr. hab. șt. farm., prof. univ. _____

Consultant științific:

CALALB Tatiana, dr. hab. șt. biol., conf. univ. _____

Autor:

CIOBANU Cristina _____

© Ciobanu Cristina, 2015

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea temei. Anghinarea - *Cynara scolymus* L. (*C. scolymus* L.) este una din cele mai străvechi plante cultivate de omenire și înscrie un istoric deosebit în tezaurul de aur al plantelor medicinale. Planta este originară din bazinul Mării Mediterane, Africa de Nord și insulele Canare [30]. Solicitarea acestei plante pentru fortificarea și asigurarea alimentului sănătos a determinat sporirea studiilor asupra anghinarei axate pe dezvoltarea tehnologiilor moderne de cultivare. În Republica Moldova (RM) anghinarea a fost introdusă în colecția Centrului de Cultivare a Plantelor Medicinale a IP USMF „Nicolae Testemițanu” (CC PM) în anul 2002. Anghinarea reprezintă un adevărat depozit natural de compuși biologici cu proprietăți farmacologice remarcabile. În prezent este elucidată compoziția chimică a plantei determinată de prezența: compușilor polifenolici [10,20], flavonoidelor [22], principiilor amare, compușilor sterolici, substanțelor tanante și antocianilor [21,24]. Raportul cantitativ al acestor compuși variază în funcție de zona de cultivare, vârsta plantei, perioada de vegetație, calitatea solului și regimul de temperaturi [4,8]. Totalul substanțelor active este direct proporțional cu perioada recoltări [16]. Particularitățile fiziologice și terapeutice ale principiilor active din plantă au condus la utilizarea produsului vegetal în calitate de remediu colagog și coleretic [11,19,27], hepatoprotector [12,28], hipolipemiant [6,15,23], antioxidant [7,11,17,18], hipoglicemiant [5], diuretic și antimicrobian [13,26] ceea ce demonstrează oportunitatea elaborării de noi produse farmaceutice standardizate cu folosirea noilor metode de design în cercetare și metode actuale de optimizare a formulării medicamentelor. Din cele expuse reiese că valorificarea speciei *C. scolymus* L. este destul de actuală pentru teoria și practica farmaceutică ceea ce a justificat realizarea acestei lucrări.

Scopul și obiectivele lucrării. Scopul tezei constă în studiul complex al speciei *C. scolymus* L. cultivată în condițiile pedoclimatice ale RM, identificarea și dozarea compușilor chimici, obținerea produselor extractive, evaluarea acțiunii biologice, obținerea și standardizarea formelor farmaceutice. Reieșind din scopul cercetării au fost definite următoarele obiective: studiul biometric, morfo-anatomic și fitochimic al speciei *C. scolymus* L.; evaluarea parametrilor de calitate pentru produsul vegetal; studiul dinamicii de acumulare a principiilor active; optimizarea obținerii și studiul produselor extractive din anghinare; formularea și standardizarea formei farmaceutice cu conținut de produs extractiv standardizat; studiul activității antioxidante în funcție de conținutul polifenolic și flavonoidic; determinarea toxicității acute a produsului extractiv standardizat; elaborarea Monografiilor Farmaceutice și Regulamentului Tehnologic privind produsul vegetal și forma farmaceutică.

Metodologia cercetării științifice. Cercetarea s-a axat pe principii moderne care vizează introducerea în cultură a plantelor medicinale, studiul biometric, macroscopic și microscopic, determinarea compoziției chimice și optimizarea extragerii principiilor active (PA) cu folosirea metodelor matematice de planificare a experiențelor. Procesul de elaborare a formei farmaceutice a fost efectuat punând la bază principiile și regulile de bună practică de fabricație a medicamentelor cu utilizarea metodelor noi tehnologice, chimice și fizico-chimice: extracție cu ultrasunete a principiilor active, obținerea granulatului în pat de aer fluidizat, cromatografia în strat subțire, spectroscopia în UV și cromatografia lichidă de înaltă performanță. În calitate de suport metodologic al studiului au servit principiile generale și metodologia cercetării farmaceutice (*Drug Development*).

Noutatea și originalitatea științifică. În premieră a fost studiată: biometria plantelor, macro- și microscopia produsului vegetal al speciei *C. scolymus* L. cultivat în condițiile pedoclimatice ale RM; optimizată obținerea extractelor standardizate din produsul vegetal *Cynarae folia*; studiată acțiunea antioxidantă în funcție de conținutul polifenolic și flavonoidic; studiată toxicitatea acută a produselor

extractive; formulată compoziția comprimatelor cu conținut de extract standardizat; elaborată documentația analitică și tehnică de normare la produs vegetal și comprimate.

Problema științifică importantă soluționată în această teză, constă în studiul biologic și farmaceutic complex al speciei *C. scolymus* L. în vederea elaborării documentelor analitice de normare a calității pentru produsul vegetal și comprimate, ca premisă în vederea autorizării lor în calitate de noi produse farmaceutice.

Semnificația teoretică a lucrării constă în generalizarea stadiului actual al cunoașterii despre specia *C. scolymus* L. și completarea tezaurului plantelor medicinale cu noi aspecte ce se referă la biometria anghinarei, principiile de extracție a compușilor chimici și obținerea formelor farmaceutice în baza acestora.

Valoarea aplicativă a lucrării. Rezultatele actualei cercetări sunt benefice pentru dezvoltarea industriei farmaceutice din RM în vederea completării sortimentului cu noi forme farmaceutice cu conținut de produse extractive standardizate din plante medicinale introduse în cultură. Studiile efectuate pot servi drept suport inițial în dezvoltarea metodelor de preformulare și formulare a comprimatelor cu produse extractive în laboratoarele de cercetare și dezvoltare ale producătorilor de medicamente. Lucrarea este o parte componentă a planului de cercetări științifice a IP USMF "Nicolae Testemițanu".

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere:

1. Introducerea în cultură a speciei *C. scolymus* L. ca sursă de materie primă pentru obținerea produselor extractive cu conținut de polifenoli și flavonoide.
2. Obținerea extractelor fluide din frunze de anghinare prin metoda asistată de ultrasunete.
3. Compoziția granulatului standardizat de anghinare obținut prin metoda de uscare în pat de aer fluidizat și fluxul tehnologic de obținere a comprimatelor.
4. Validarea metodelor de dozare spectrofotometrică în UV și de cromatografie lichidă de înaltă performanță a totalului polifenolic și flavonoidic
5. Stabilirea activității antioxidante în funcție de totalul principiilor fenolice conținute în frunzele de anghinare.

Implementarea rezultatelor științifice. În baza rezultatelor experimentale obținute au fost elaborate: monografia farmaceutică „*Frunză de anghinare, 50 g*” implementată la întreprinderea farmaceutică autohtonă „Medfarma” S.R.L., confirmată prin actul din 10.02.2015; monografia farmaceutică și regulamentul tehnologic de producere „*Comprimate de anghinare, 5 mg*”, implementate la întreprinderea farmaceutică autohtonă Î.M. „RNP Pharmaceuticals” S.R.L., confirmate prin actul din 12.02.2015.

Aprobarea rezultatelor științifice. Rezultatele cercetărilor științifice efectuate au fost relevate în cadrul unor foruri naționale și internaționale: conferințe științifice anuale ale colaboratorilor și studenților IP USMF „Nicolae Testemițanu” (Chișinău 2011, 2012, 2014); congresul internațional medical pentru studenți și tineri cercetători „MedEspera” (Chișinău 2012, 2014); congresul internațional „Phytopharm” (Saint Petersburg 2012; Viena 2013); conferința internațională „Modern Phytomorphology” (Lvov 2012); congresul bucovinean internațional medical pentru studenți și tineri cercetători (Cernăuți 2014).

Publicații la tema tezei. În baza materialelor cercetării au fost publicate 15 lucrări științifice în volum de 2,8 coli de autor.

Volumul și structura tezei. Teza este prezentată în limba română cu titlul de manuscris pe 108 pagini text de bază tehnoredactat; sub aspect structural constă din următoarele compartimente: introducere, 4 capitole, concluzii și recomandări. Teza este ilustrată cu 32 tabele, 59 figuri, 17 anexe și indice bibliografic ce enumeră 168 surse.

Cuvinte cheie: *Cynara scolymus* L., *Cynarae folia*, anghinare, biometrie, macroscopie, microscopie, polifenoli, flavonoide, extracte fluide, granulat, extracție cu ultrasunete, granulare în pat de aer fluidizat, spectrofotometrie, cromatografie lichidă de înaltă performanță, optimizare, standardizare, validare, comprimate, antioxidant, toxicitate acută, documentație analitică de normare.

CONȚINUTUL TEZEI

1. CARACTERISTICA GENERALĂ A SPECIEI *CYNARA SCOLYMUS* L.

În capitolul 1 sunt relatate informații din literatura de specialitate cu referire la caracteristica generală a speciei *C. scolymus* L. Sunt prezentate date bibliografice generale din istoricul utilizării, încadrarea sistematică a genului *Cynara*, descrierea botanică, ecologia și răspândirea plantei, compoziția chimică și acțiunea farmacologică. Studiul bibliografic a evidențiat, că specia *C. scolymus* L. posedă un spectru vast de acțiuni terapeutice, dintre cele mai importante fiind: hepatoprotectoare și hepatostimulatoare, coleretică, hipocolesterolemică, hipoglicemiantă, diuretică, antimicrobiană și antioxidantă. De remarcat este faptul că produsul vegetal - *Cynarae folium*, este inclusă în Farmacopea Română, ceea ce sugerează importanța acestui produs pentru fitoterapie.

Grație proprietăților terapeutice incontestabile ale frunzei de anghinare, planta este cultivată în multe țări europene, iar din anul 2002 a fost introdusă și în colecția CC PM.

2. STUDIUL MORFO-ANATOMIC ȘI FITOCHIMIC AL SPECIEI *CYNARA SCOLYMUS* L.

2.1. Studiul morfologic și anatomic al speciei *C. scolymus* L.

Deoarece condițiile pedoclimatice ale RM se deosebesc de cele din regiunile de origine ale anghinarei, pe parcursul anilor 2010-2012 s-au efectuat observații fenologice asupra etapelor dezvoltării ontomorfogenetice ale plantelor de anghinare. Studiul biometric al speciei *C. scolymus* L. s-a realizat în cadrul CC PM, care este localizat în partea de Sud - Vest a regiunii Centrale a RM. Anghinarea în condițiile pedoclimatice ale RM este o plantă erbacee, perenă, robustă cu înălțimea 1,5 – 2,0 m (Figura 1).



Fig. 1. Plante de anghinare cultivate în CC PM. (a. – faza de butonizare; b. – faza de înflorire)

În primul an de vegetație planta dezvoltă în mediu 7-12 frunze bazale, mari, cu lungimea de până la 80 cm, dispuse în rozetă. Frunzele au un petiol dezvoltat, cărnos de culoare argintie și limbul penat - sectat sau fidat, cu 5-8 perechi de lacinii lanceolate, mucronate, marginea mășcat serată, partea superioară – glabră, iar cea inferioară alb-tomentoasă (Figura 2). Rozeta cu frunze bazale are un mare rol fitocenotic – protejează solul atât de supraîncălzire și expunerea directă la razele solare, cât și de evaporarea și pierderea umidității acestuia. Acest fapt asigură dezvoltarea mai viguroasă a tulpinilor, frunzelor tulpinale și calatidiilor. Frunzele tulpinale sunt alterne și aproape sesile. De la baza tulpinii spre apex, dimensiunile frunzelor se micșorează.

Tulpina aeriană apare în cel de-al doilea an, este erectă, viguroasă, ramificată de la bază și are aspect tomentos. La vârful tulpinilor se dezvoltă florile unite în inflorescențe de tip calatidiu globulos (antodiu). Bracteele cărnoase la bază, cu apex acut sau obtuz și ușor pungente ale involucrului sunt aranjate acropetal. Pe discul receptaculului cărnos sunt dispuse florile centrale tubulare, bisexuate, iar marginal florile sterile, ambele de culoare roșu-violaceu. Fructele reprezintă achene brune, ușor comprimate, însoțite de papus de culoare galben-albicioasă.

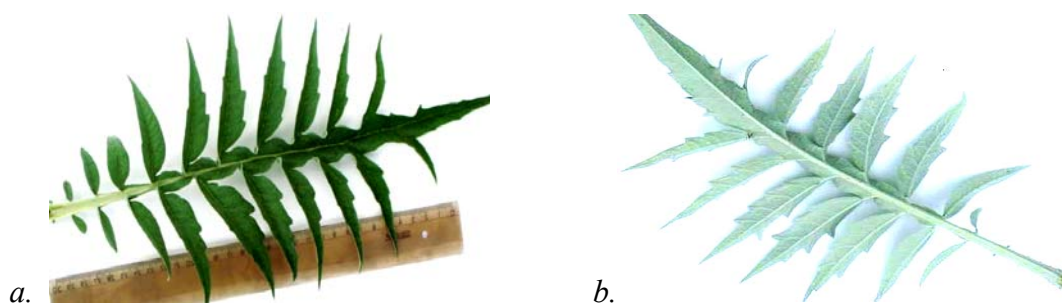


Fig. 2. Aspectul frunzelor de anghinare.
(a. – partea superioară a frunzei ; b. – partea inferioară a frunzei de anghinare)

Studiul biometric a fost realizat pe durata a 3 perioade de vegetație (2010-2012). Analiza parametrilor biometrici denotă că înălțimea maximă a plantelor variază între 121-185 cm, fapt ce favorizează dezvoltarea unui număr mare de etaje foliare.

Plantele ramifică în 3-4 în partea bazală a tulpinii, care, la rândul lor, ramifică spre extremități, iar fiecare extremitate se termină cu calatidii cu diametru de la 7 la 9 cm. O ramificație formează în mediu 3-5 calatidii, iar o plantă poate dezvolta în mediu 8-19 unități.

Rezultatele studiului demonstrează, că în condițiile pedoclimatice ale RM plantele de anghinare dezvoltă o suprafață foliară impunătoare cu valorile medii ale etajelor foliare de la 9 la 17, a lungimii limbului foliar de la 25 la 30 cm și a lățimii de la 13 la 17 cm, fapt ce prezintă un interes deosebit, deoarece frunza de anghinare *Cynarae folia* este recunoscută pe plan mondial ca produs vegetal medicinal [9].

Produsul vegetal (PV) prezintă un amestec fragmentat din frunze de anghinare, cu dimensiuni în limita cuprinsă între 3 și 7 mm, cu miros specific și nervură mediană pronunțată. Produsul vegetal are un aspect păslos de culoare verde-albicioasă, datorită prezenței perilor tectori pe ambele epiderme.

Examenul microscopic a fost realizat în laboratorul fitochimic al Catedrei de farmacognozie și botanică farmaceutică al IP USMF „Nicolae Testemițanu” la microscopul optic binocular *Micros* (Austria), cu puterea de mărire a obiectivului 4x, 10x, 40x și fotografiate cu o cameră digitală, cuplată la calculator. În calitate de material botanic (proaspăt și uscat) pentru cercetare au servit frunzele bazale și tulpinale de anghinare colectate în perioada de înflorire a plantei din colecția CC PM. Uscarea s-a efectuat pe cale naturală, fiind aranjate în straturi subțiri, în încăperi bine aerisite. PV

uscate au fost păstrate în ambalaje din hârtie și cutii de carton în locuri uscate, bine aerisite și ferite de lumină.

Examenul microscopic a fost realizat pe secțiuni transversale, radiale și longitudinale, obținute din frunze proaspete și utilizând preparate superficiale din material javelizat cu cloralhidrat.

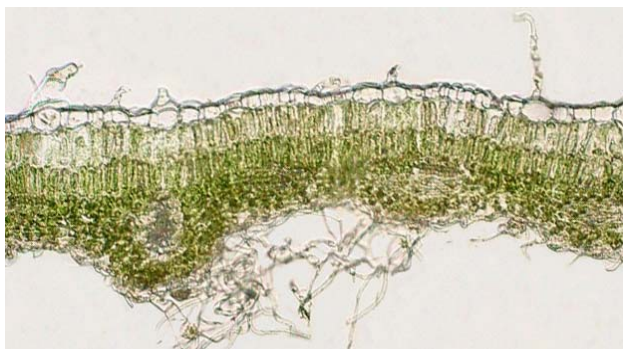


Fig. 3. Secțiune transversală prin limbul frunzei de anghinare ($\times 10$).

Pe secțiunile transversale ale limbului, se disting epidermele inferioară și superioară unistratificate, alcătuite din celule poligonale cu pereți tangențiali externi ușor îngroșați, iar cei radiari și tangențiali interni subțiri, la exterior acoperite de un strat de cuticulă (Figura 3).

Epiderma superioară și inferioară dezvoltă 2 tipuri de peri: tectori și glandulari. Se disting *peritectori* relativ scurți pe ambele epiderme cu concentrare mai mare pe nervuri, dar mai des întâlniți pe epiderma inferioară și în formă de șfichi, lungi, pluricelulari alcătuiți din bază uniserată și un apex filamentos subțire și sinuos. Sunt bine dezvoltați pe epiderma inferioară, localizați preponderent pe nervuri, conferind frunzei un aspect tomentos, cenușiu. Perii glandulari sunt destul de mari, prezenți din abundență pe ambele epiderme. Sunt alcătuiți din picioruș scurt format din 1-2 celule și o glandă sferică, globuloasă cu conținut de culoare brună (Figura 4).

Stomatele sunt prezente pe ambele epiderme, sunt de tip anomocitic și se întâlnesc cu o frecvență mai mare pe epiderma inferioară (Figura 5).

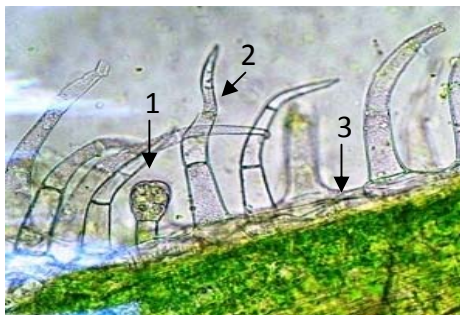


Fig. 4. Un fragment al marginii epidermei inferioare ($\times 40$).

(1 - păr glandular; 2 - păr tector; 3 - cuticulă; 4 - stomată)



Fig. 5. Un fragment al epidermei inferioare ($\times 40$).

Pe secțiuni transversale ale limbului foliar, sub epiderma superioară, se distinge mezofilul de tip dorso-ventral cu unul sau două rânduri de celule palisadice (Figura 6). Aceste celule sunt poligonale, bine împachetate, cu număr mare de cloroplaste cu poziție preponderent parietală. Celulele mezofilului lacunos de formă sferic-lobată cu mai puține cloroplaste și meaturi intercelulare mari vin în contact cu epiderma inferioară. În mezofilul frunzei sunt prezente fasciculele colaterale închise, înconjurate de sclerenchim. În partea externă a coastelor se distinge țesut mecanic – colenchim (Figura 7).

Pețiolul frunzei în secțiune transversală are o formă scafoidă (Figura 8). Suprafața superioară a pețiolului este ușor concavă, cea inferioară - convexă, cu nervațiuni. Epiderma este acoperită cu un

strat subțire de cuticulă pe toată suprafața. În secțiune transversală celulele epidermei au o formă pătrată sau dreptunghiulară pe care se observă prezența rară a perilor multicelulari. Colenchimul angular este situat sub epidermă în regiunea nervurilor. Restul spațiului este ocupat de parenchim în care sunt prezente un număr mare de fascicule conducătoare, colaterale de tip deschis, dispuse în cerc.



Fig. 6. Secțiune transversală prin frunză ($\times 40$).

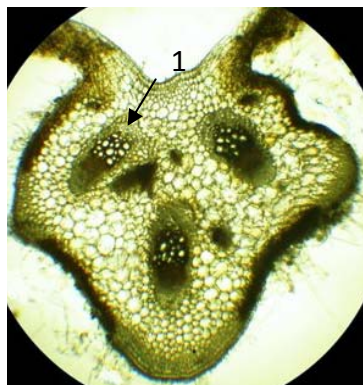


Fig. 7. Secțiune transversală prin frunză ($\times 10$).

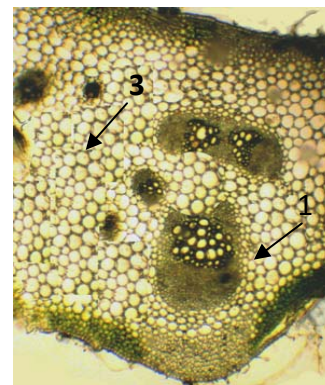


Fig. 8. Secțiune transversală prin pețiol ($\times 10$).

(1 - vase libero-lemnoase, 2 - colenchim, 3 – parenchim)

Din rezultatele studiului, caracterele microscopice de diagnostic ale produsului vegetal *Cynarae folia* sunt:

- Epiderma cu 2 tipuri de peri: - peri tectori cu baza uniserată și apex filamentos, subțire în formă de șfichi, în abundență pe nervuri și peri tectori mai puțin numeroși din 4-6 celule globulos-ovoide cu vârful ușor teșit; - peri glandulari relativ mari cu picioruș din 1-2 celule și glandă unicelulară cu conținut brunificat prezenți pe ambele epiderme;
- Limb de tip amfistomatic;
- Mezofil diferențiat – dorsoventral;
- Stomate de tip anomocitic, mult mai numeroase și mai mici pe epiderma inferioară;
- Fascicule vasculare colaterale libero-lemnoase deschise într-o teacă periciclică lignificată, localizate în rilele de pe fața superioară a frunzei;
- Țesut mecanic de tip colenchim angular, localizat sub epidermă în dreptul fasciculelor conducătoare, atât în lamină, cât și în pețiol.
- Localizarea fasciculelor de conducere în pețiol pe cerc.

Acest complex de caractere structural-diagnostice va servi ca suport diagnostic la identificarea produsului vegetal *Cynarae folia* în cazul examenului microscopic.

A fost realizat studiul comparativ al dimensiunilor diferitor structuri ale frunzelor bazale și tulpinale de anghinare din colecția CC PM.

Rezultatele analizei denotă că frunzele bazale dezvoltă structuri cu dimensiuni mai mari comparativ cu frunzele tulpinale. La frunzele bazale, epiderma superioară este expusă permanent la acțiunea razelor solare, în orele amiezii pe perioada estivală, fiind în exces, sub un unghi de 95° , pe când epiderma inferioară este mult mai protejată.

Frunzele tulpinale sunt aranjate sub un unghi ascuțit față de suprafața solului, astfel epidermele atât superioare, cât și inferioare nu sunt expuse direct acțiunii razelor solare și astfel structurile anatomice a laminei sunt echilibrate, nu este un decalaj mare între valorile epidermei superioare și inferioare, comparativ cu frunzele bazale, la care:

- grosimea epidermei inferioare este mai mică, comparativ cu epiderma superioară;
- grosimea parenchimului palisadic mai mare, iar cel lacunos mai mic;
- densitatea perilor tectori pe unitate de suprafață a epidermei inferioare este mai mică pe frunzele bazale decât pe cele tulpinale.

Aceste rezultate se explică prin poziția frunzelor față de sursa de lumină și radiație.

2.2. Studiul fitochimic al produsului vegetal *Cynarae folia*

Studiul fitochimic al produsului vegetal *Cynarae folia* a inclus: analiza calitativă prin aplicarea reacțiilor specifice de identificare, prin metoda de cromatografie în strat subțire (CSS) și cromatografie de lichide de înaltă performanță (CLIP); analiza cantitativă a fost realizată prin metode spectrofotometrice de dozare și prin metoda CLIP [9,14].

În calitate de material biologic au servit frunzele de anghinare recoltate în perioada de înflorire de la plantele din colecția CC PM în perioada anilor 2011-2012.

Identificarea compușilor flavonoidici cu reacții specifice. Pentru identificarea constituenților flavonoidici au fost aplicate un șir de reacții specifice de colorare și sedimentare, iar rezultatele reacțiilor calitative au demonstrat prezența: agliconilor flavonozidelor, flavonelor, flavononelor, flavonolilor, flavononolilor și catehinelor.

Identificarea compușilor polifenolici și flavonoidici cu metoda CSS.

Pentru identificarea compușilor polifenolici și flavonoidici a fost aplicată metoda CSS. Pentru analiză a fost pregătit extractul frunzelor de anghinare, cu utilizarea în calitate de extragent etanol 70% (V/V). Valorile R_f -urilor constituenților fenolici identificați pe cromatogramele extractului etanolic din frunze de anghinare sunt prezentate în Figura 9. În rezultatul analizei CSS la lumina zilei și în UV, revelate cu acid difenilboric de 1% al eterului aminoetilic în metanol, macrogol 400 în metanol, prin compararea R_f -urilor spoturilor substanțelor de referință, putem constata prezența în *Cynarae folia* a rutozidei, cvercetozidei, acidului clorogenic și acidului cafeic.

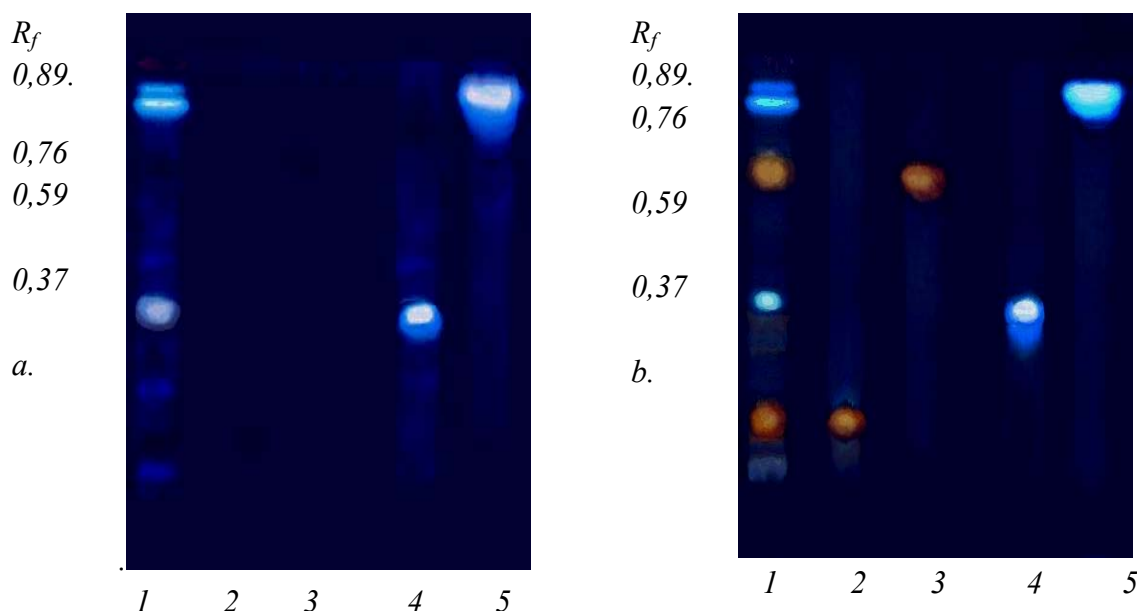


Fig. 9. CSS pentru extractul *Cynarae folia* în UV.

1. *Cynarae folia* extract; 2 – rutozidă; 3 – cvercetozidă; 4 – acid clorogenic; 5 – acid cafeic.

(a. – fără revelare, b. - revelare cu acid difenilboric de 1% al eterului aminoetilic în metanol, Macrogol 400 în metanol)

Identificarea și dozarea compușilor chimici din specia *C. scolymus* L. cu metoda CLIP.

Cercetările au fost efectuate în laboratorul Departamentului de Tehnică Farmaceutică și Biofarmacie al Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, România. În calitate de materiale biologice pentru analize au servit: frunze bazale, frunze tulpinale, tulpini, inflorescențe și bractei de anghinare. S-a recurs la studiul diferențiat al diferitor părți morfologice pentru a le evidenția pe cele cu conținut maxim de principii active (PA).

Au fost utilizate 18 standarde de compuși fenolici (Figura 10) – 1,2 - acid caftaric, acid gentisic, 3 - acid cafeic, 4 - acid clorogenic, 5 - acid paracumaric, 6 - acid ferulic, 7 - acid sinapic, 8 - hiperozid, 9 - isocvercitrin, 10 - rutozidă, 11 - miricetol, 12 - fisetină, 13 - cvercitrin, 14 - cvercetol, 15 - patuletină, 16 - luteolină, 17 - kampferol și 18 - apigenină.

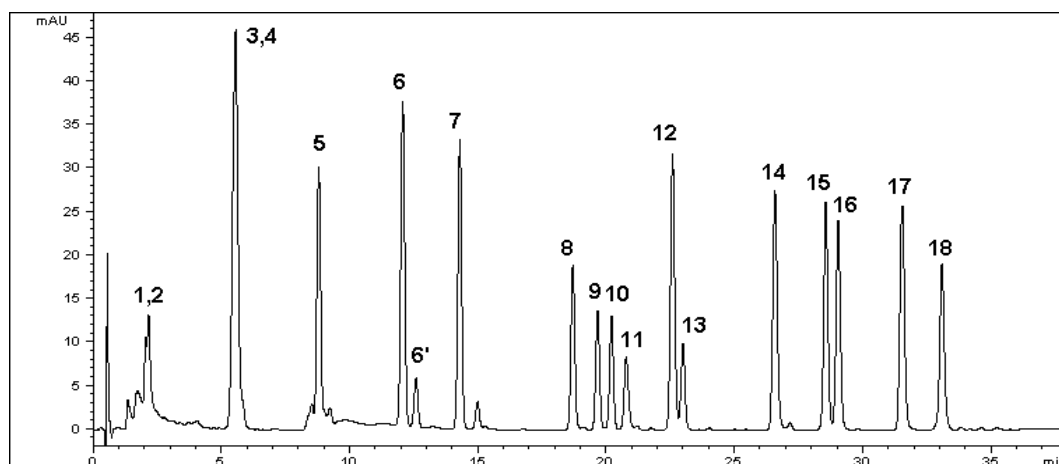


Fig. 10. Cromatograma amestecului de 18 polifenoli în detecție UV.

Studiile au fost efectuate la cromatograful pentru CLIP cuplat cu spectrometru de masă, autosampler HP 1100, termostat HP 1100, detector UV HP 1100, spectrometru de masa *Agilent Ion Trap 1100 VL*.

Acizii polifenolcarboxilici au fost detectați la lungimea de undă 330 nm, iar flavonoidele și agliconii acestora la 370 nm. În rezultatul analizei frunzelor bazale și tulpinale, a tulpinilor, bracteilor și inflorescențelor au fost identificați 7 compuși cu conținutul în descrescere după cum urmează: acid clorogenic, acid cafeic, apigenină, luteolină, acid ferulic, acid p-cumaric și acid gentisic. În inflorescențele plantei au fost identificați și dozați doar 4 compuși: acidul clorogenic, apigenină, luteolină și acidul cafeic.

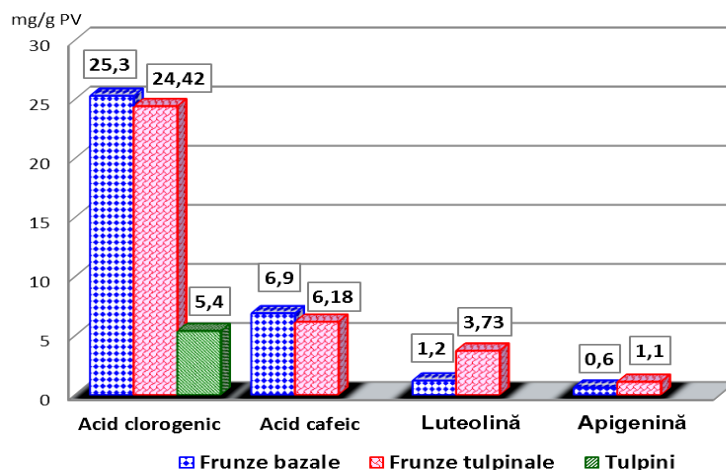


Fig. 11. Principii biologic active cu conținut maxim dozat CLIP (mg/g PV).

Conținutul compușilor activi cu masa $\geq$ 1 mg raportat la g PV a fost determinat doar în extractele din ambele tipuri de frunze și în extractele din tulpini de anghinare (Figura 11), cantitățile celorlalți compuși au valori mai reduse de 1 mg/g PV. Compusul cu cea mai mare concentrație s-a dovedit a fi acidul clorogenic cu concentrația de 25,3 mg/g PV pentru extractul din frunze bazale, 24,42 mg/g PV pentru cel din frunzele tulpinale și 5,4 mg/g PV pentru extractul din tulpini.

Dozarea spectrofotometrică a principiilor active în produsul vegetal Cynarae folia. Din metodele fizico-chimice de analiză cantitativă a produsului vegetal *Cynarae folia* în Farmacopea Română ed. a X-a (FR X) sunt menționate metodele spectrofotometrice de analiză a totalului flavonoidic și a totalului polifenolic. Aceste metode au fost aplicate pentru determinarea perioadei de maximă acumulare a totalului polifenolic și flavonoidic în frunzele bazale și tulpinale de anghinare. În rezultatul studiului s-a demonstrat influența perioadei de recoltare în procesul de acumulare a PA (Figura 12, 13).

Rezultatele dozării spectrofotometrice a totalului de flavonoide (Figura 12) denotă faptul că acumularea maximă este determinată în perioada de până la înflorire a plantei, în faza de butonizare, caracteristic pentru ambele tipuri de frunze ($20,08 \pm 1,39$ mg/g – frunze bazale și respectiv $19,15 \pm 0,93$ mg/g – frunze tulpinale).

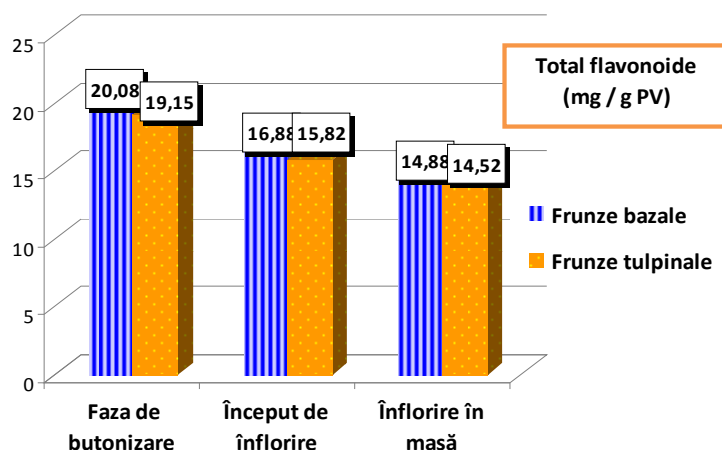


Fig. 12. Dinamica acumulării totalului flavonoidic în frunzele de anghinare.

Conținutul cel mai înalt a compușilor polifenolici este determinat la început de înflorire a anghinarei ($52,66 \pm 1,93$ mg/g în frunze bazale, $44,32 \pm 3,0$ mg/g în frunze tulpinale).

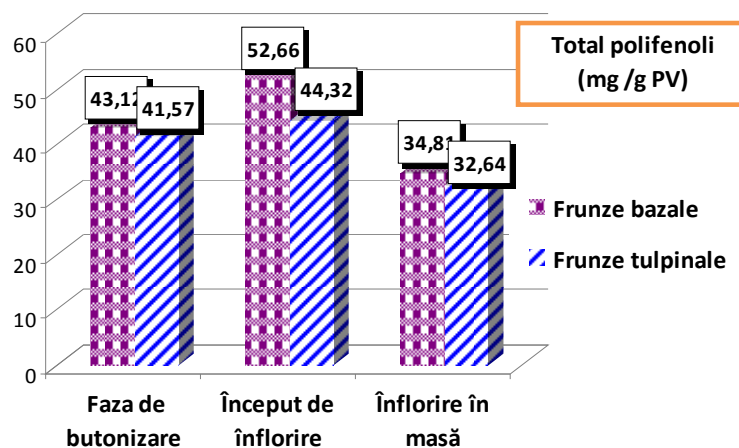


Fig. 13. Dinamica acumulării compușilor polifenolici în frunzele de anghinare.

3. OPTIMIZAREA EXTRACȚIEI PRINCIPIILOR ACTIVE DIN PRODUSUL VEGETAL *CYNARAE FOLIA*

3.1 Obținerea produselor extractive lichide și dozarea principiilor active.

În scopul studiului comparativ al produselor extractive lichide cu cel mai înalt randament de extracție a PA din PV *Cynarae folia* au fost aplicate metodele de obținere a extractelor fluide 1:1 și 1:2 (repercolare după *Squibb* și *Bosin* și repercolare cu fracționarea produsului vegetal în părți egale în ciclu neterminat) și metoda farmacopeică de obținere a tincturii 1:5.

Produsele extractive obținute au fost supuse determinării cantitative prin metoda de dozare spectrofotometrică descrisă în FR X, cu unele modificări, la spectrofotometru *UV-VIS "Perkin Elmer" Lambda*, efectuată la Catedra de chimie farmaceutică și toxicologică a IP USMF "Nicolae Testemițanu". Totalul flavonoidic (%) a fost evaluat în recalcul la rutozidă (standard, *Sigma Aldrich*), iar cel polifenolic – în recalcul la cinarină (standard, *Sigma Aldrich*).

Rezultatele dozării spectrofotometrice (Figura 14), a totalului flavonoidic, au demonstrat faptul că în tinctură este prezent conținutul maximal de flavonoide ($1,381 \pm 0,0220\%$), pe când în extractul fluid 1:1 este determinată cantitatea minimă de flavonoide ($0,253 \pm 0,0130\%$). Conținutul maximal al totalului polifenolic se regăsește în tinctura de anghinare - $2,062 \pm 0,0073\%$; urmează în descreștere extractul fluid 1:2, obținut prin metoda *Bosin* ($0,776 \pm 0,0117\%$), extractul fluid 1:2, obținut prin metoda *Squibb* ($0,720 \pm 0,0071\%$), iar conținutul cel mai redus de PA s-a determinat în extractul fluid 1:1 ($0,339 \pm 0,0088\%$), obținut prin metode de repercolare cu fracționarea produsului în părți egale în ciclu neterminat. În studiul dat a fost demonstrată influența concentrației etanolului asupra procesului de extracție în obținerea extractelor fluide 1:2. Etanolul de 35% a prezentat cel mai redus randament de extracție a PA.

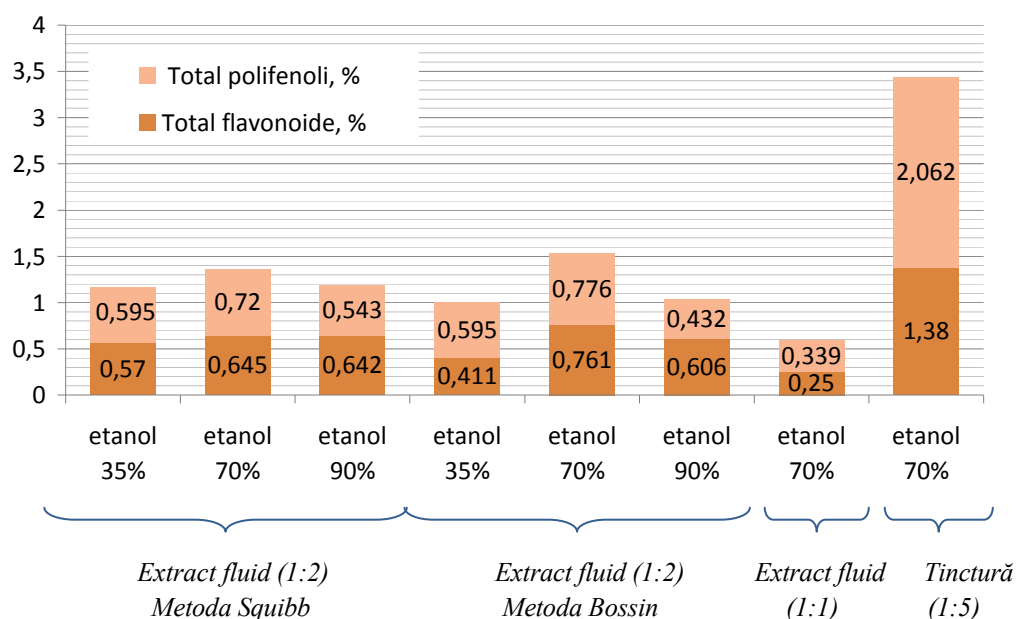


Fig. 14. Conținutul de PA fenolice (%) în produse extractive de anghinare.

3.2. Optimizarea extracției principiilor active din *Cynarae folia*.

În vederea sporirii conținutului de principii active în produsele extractive obținute din PV de anghinare au fost folosite metode cu intensificarea procesului de extracție. Pentru studiul metodelor de macerare s-a folosit *macerarea simplă* (metoda descrisă în FR X) și *macerarea prin agitare*: turboextracție și extracție cu ultrasunete. *Turboextracția* s-a efectuat la temperatura camerei, într-un recipient de metal inoxidabil cu pereți dubli, în care s-au introdus extractele, iar ulterior au fost supuse agitării prin intermediul unui agitator cu 4 cuțite la o turație de 12.000 turații/minut. *Extracția cu*

ultrasunete s-a realizat în condiții analogice turboextracției, la temperatura camerei, extractele au fost supuse unei agitări puternice prin intermediul ultrasunetelor.

Pentru realizarea studiului s-a folosit un *plan experimental fracționat D optimal cu trei factori și două niveluri (plan experimental 1)*. În calitate de variabile independente au servit: metodele de extracție (extracție prin metoda clasică de macerare; turboextracție și extracția cu ultrasunete) (X_1); raportul dintre cantitatea de produs vegetal față de cantitatea de solvent (m/v) - 1/50; 1/100; 1/200 (X_2); concentrația extragentului - etanol de 30%; 50%; 70% (X_3). Conținutul totalului de polifenoli (Y_1) și totalului de flavonoide (Y_2) în extractele obținute au servit ca variabile dependente.

Realizarea planului de experiență, calcularea coeficienților, a parametrilor statistici și a fitării datelor pentru evaluarea rezultatelor s-a efectuat cu ajutorul programului de optimizare Modde 9.0 (Umetrics, Suedia). Matricea planului experimental și matricea cu răspunsuri conține 21 de categorii cu rezultate ale determinării cantitative a totalului polifenolic și flavonoidic.

Fitarea datelor s-a făcut utilizând metoda *Partial Least Squares* (PLS). În Figurile 15 și 16 se demonstrează influența factorilor de formulare asupra suprafețelor de răspuns prin intermediul coeficienților ecuațiilor și curbelor de izorăspuns.

Prin creșterea cantității de solvent se micșorează răspunsul Y_1 și Y_2 , însă pentru totalul flavonoidic este un factor mai expresiv. Concentrația etanolului influențează de asemenea ambele răspunsuri, odată cu creșterea concentrației se observă o sporire a extracției PA, însă o diferență vizibilă se constată între concentrațiile 30% și 70%, mai puțin între concentrațiile 50% și 70%.

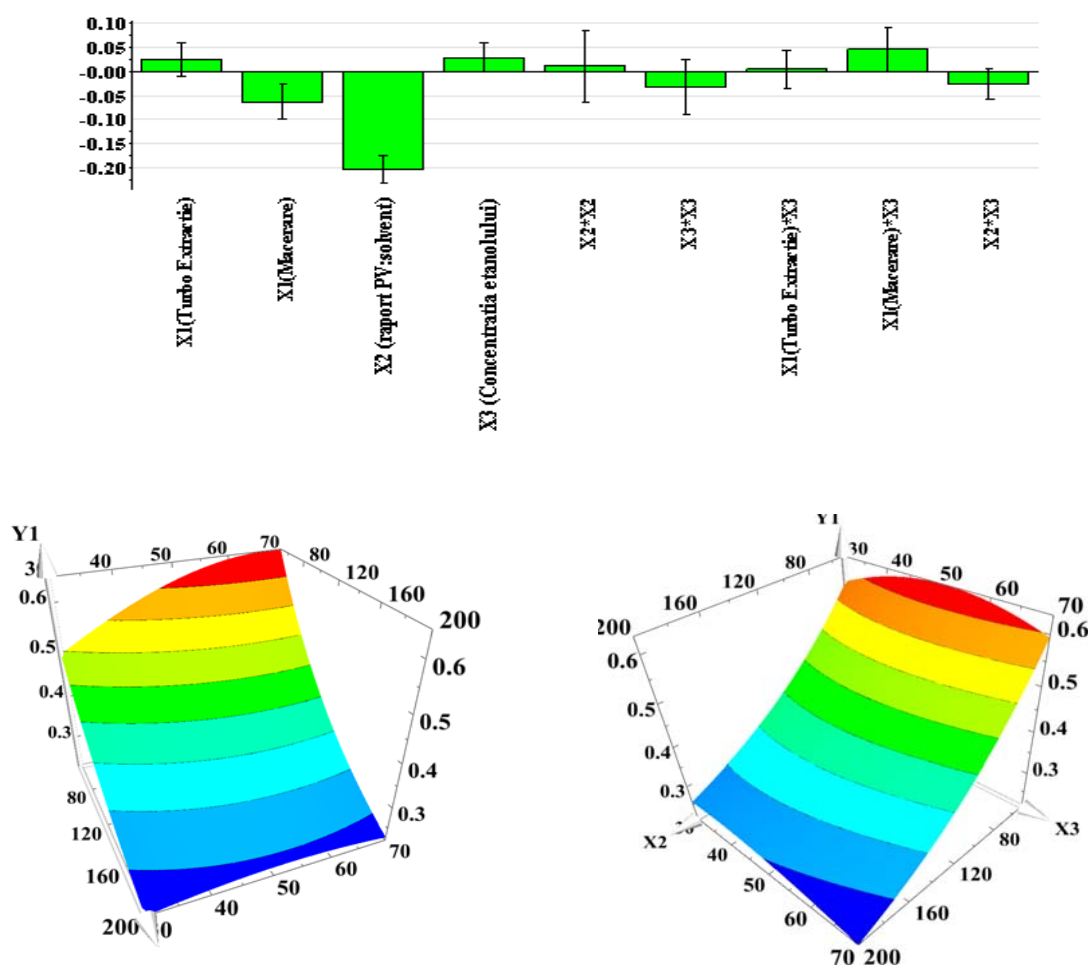


Fig. 15. Influența factorilor de formulare asupra răspunsului - Y_1 , Concentrația în flavonoide (mg/ml).

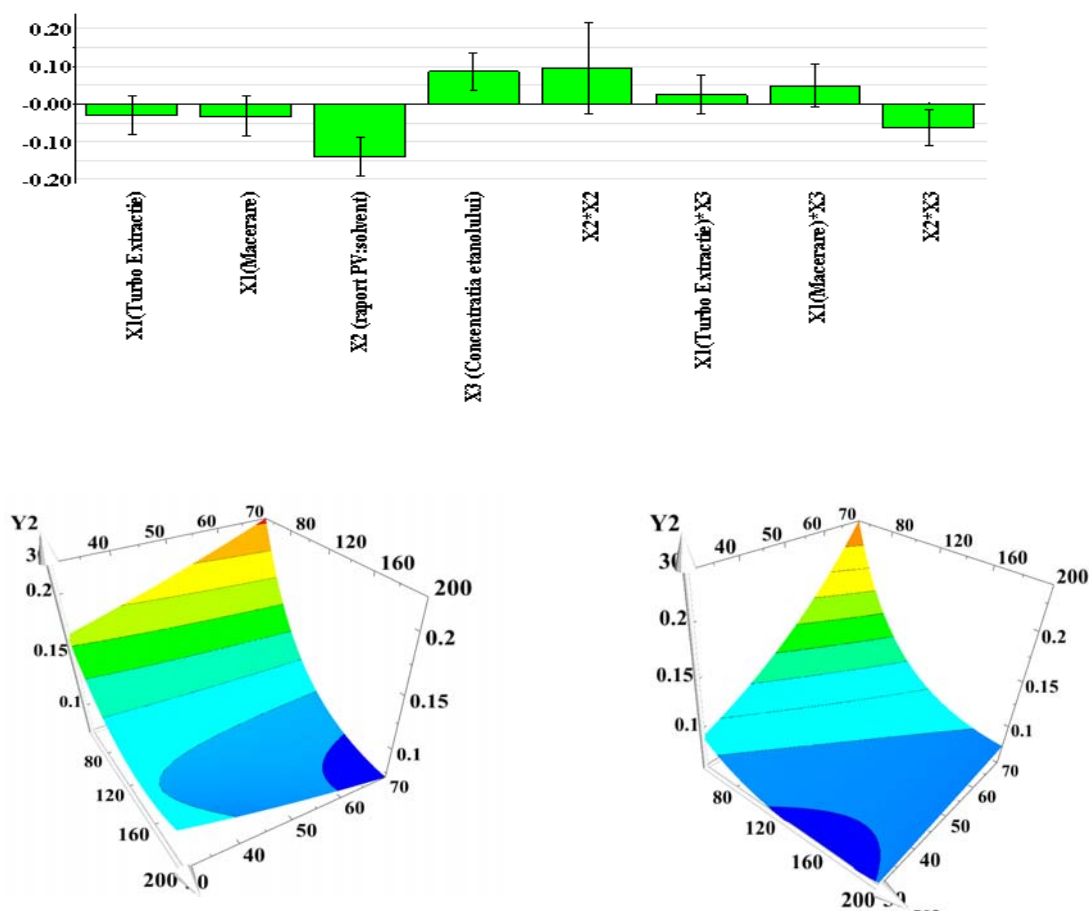


Fig. 16. Influența factorilor de formulare asupra răspunsului - Y_2 , Concentrația în polifenoli (mg/ml).

Rezultatele studiului comparativ al metodelor de macerare au demonstrat că conținutul cel mai ridicat de principii active în probele analizate se regăsește în extractele obținute prin macerare asistată de ultrasunete, în care s-a determinat conținutul maximal de polifenoli – 0,64739 mg/ml și flavonoide – 0,26093 mg/ml, obținut cu raportul PV:extragent - 2:100 și etanol 70%.

Prin urmare, ca metodă de elecție pentru o extracție maximă polifenolică și flavonoidică din frunze de anghinare este metoda cu ultrasunete, metodă simplă, rapidă, eficientă și selectivă de extracție.

Pentru optimizarea extracției prin metoda cu ultrasunete a PA din PV *Cynarae folia* s-a folosit un *plan experimental fracționat rezoluție V+cu cinci factori și două niveluri 2^{5-2}* (plan experimental 2), în care s-a studiat influența temperaturii de lucru (X_1), durată extracției (X_2), concentrația etanolului (X_3), intervalul de puls (X_4) și amplitudinea (X_5) aparatului cu ultrasunete. Conținutul totalului de flavonoide (Y_1) și polifenoli (Y_2) în extracțiile obținute servesc ca variabile dependente.

Realizarea planului de experiență, calcularea coeficienților, a parametrilor statistici și a fitării datelor pentru evaluarea rezultatelor s-a efectuat cu ajutorul programului de optimizare Modde 9.0 (Umetrics, Suedia). Fitarea datelor urmată de calcularea parametrilor statistici pentru validarea planului experimental s-a realizat utilizând metoda *Partial Least Squares (PLS)*. Rezultatele obținute la fitarea datelor sunt prezentate în Tabelul 1.

Rezultatele testului ANOVA obținute pentru cele 2 răspunsuri demonstrează că rezultatele sunt bune la toate răspunsurile studiate (p este mai mic de 0,05 pentru model și este mai mare de 0,05 pentru eroare). Din analiza curbelor de izorăspuns s-a observat că odată cu creșterea temperaturii, concentrației de etanol și a duratei de extracție este influențată concentrația polifenolilor și

flavonoidelor în probele experimentale, iar intervalul de puls și amplitudinea aparatului de ultrasonare, la o frecvență constantă de 30kHz, în experimentul prezentat, favorizează extracția PA la capacitatea maximă de lucru.

Tabelul 1. Rezultatele obținute la fitarea datelor

	R^2	R^2 Adj.	Q^2	SDY	RSD	N	Validarea modelului	Reproductibilitate
Concentrația totalului flavonoidic (mg/ml) (Y_1)	0,99348	0,983238	0,93389	0,21530	0,027875	19	0,882579	0,980935
Concentrația totalului polifenolic (mg/ml) (Y_2)	0,89708	0,794164	0,59650	0,15471	0,070193	19	0,958509	0,615192

În rezultatul studiului a fost stabilită formula optimă de lucru: temperatura de extracție - 80°C; durata de extracție - 30 minute; concentrația etanolului - 70%.

3.3. Obținerea și studiul produsului extractiv uscat.

Granularea în pat de aer fluidizat se caracterizează prin pulverizarea continuă a soluției de liant peste materialul fluidizat, concomitent cu uscarea umezelii excesive existente, datorită fluxului ascendent de aer. După adăugarea întregii cantități de soluție – liant, continuă uscarea granulatului în același aparat. Tehnica de granulare în pat de aer fluidizat este la ora actuală foarte des folosită în industria farmaceutică pentru că permite producerea de granule uniforme [1,2,29]. Cu acest scop a fost folosit granulatorul în pat de aer fluidizat Aeromatic (Stearea I).

Pentru obținerea granulatului, care prezintă materie primă în vederea procesării ulterioare în formă farmaceutică solidă, au fost selectați excipienții: celuloză microcristalină și lactoză monohidrat în raport de 6:4, fapt determinat din constatările referitoare la curgerea amestecului de pulberi, cât și din considerentele de hidrofobicitate ale substanțelor auxiliare, ce impun limite în folosirea lor. În procesul de obținere a granulatului, volumul extractului lichid a fost pulverizat în 5 etape: 30%, 25%, 20%, 15% și la final ultimele 10%; după fiecare etapă la care s-a adăugat cantitatea respectivă de extract s-au prelevat probe pentru analiză. În rezultat s-au obținut 3 serii de granulate, având câte 5 probe de analiză fiecare (subserii).

Seriile de granulate au fost supuse analizei cantitative prin metode spectrofotometrice de dozare. Astfel, a fost obținut granulat, cu conținutul totalului polifenolic, în recalcul la acid galic de 0,75 mg/0,1 g granulat (Figura 17), de asemenea a fost demonstrată validitatea procesului tehnologic de uscare în pat de aer fluidizat prin omogenitatea conținutului polifenolic determinat în toate probele seriilor de granulate.

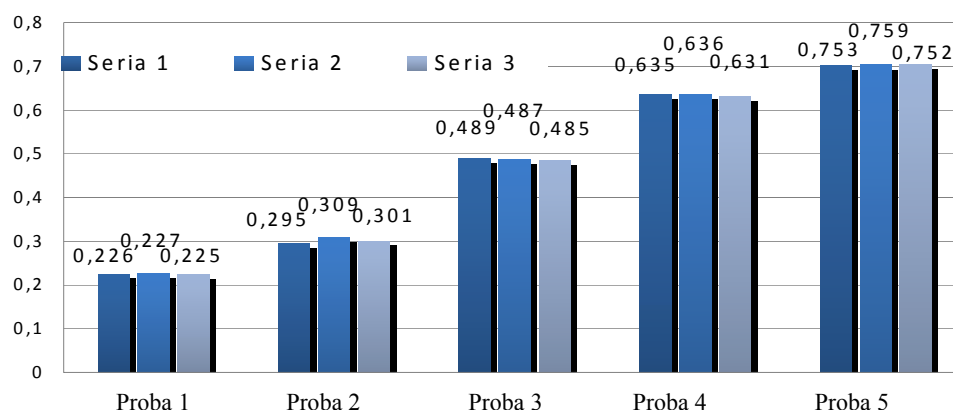


Fig. 17. Totalul polifenolic în granulatul de anghinare (mg/0,1 g granulat).

Rezultatele determinării cantitative a totalului flavonoidic a demonstrat omogenitatea procesului de uscare a extractelor fluide (Figura 18). Valoarea medie a conținutului totalului flavonoidic determinat, în recalcul la rutozidă, este de 0,40 mg/0,1 g granulat.

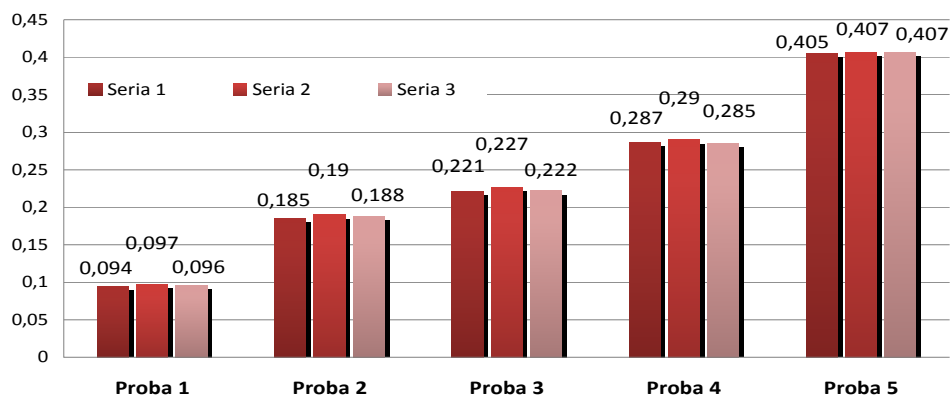


Fig. 18. Totalul flavonoidic în granulatul de anghinare (mg/0,1 g granulat).

Tehnica de granulare în pat de aer fluidizat a permis obținerea unui produs extractiv uscat (granulat) cu proprietăți farmaceutice optime: o curgere conform indicelui Carr - de la mediu (20,8 g/s) - la excelent (8,9 g/s); raportul Haussner - aproximativ 1,2, ceea ce indică o curgere ușoară pentru seriile de granulate analizate; dimensiunea preponderentă a particulelor - de la 50 la 200 μm , caracteristică pentru o distribuție granulometrică omogenă; valoarea unghiului de repaus nu depășește 30 de grade, ceea ce denotă o capacitate bună de curgere a granulatului.

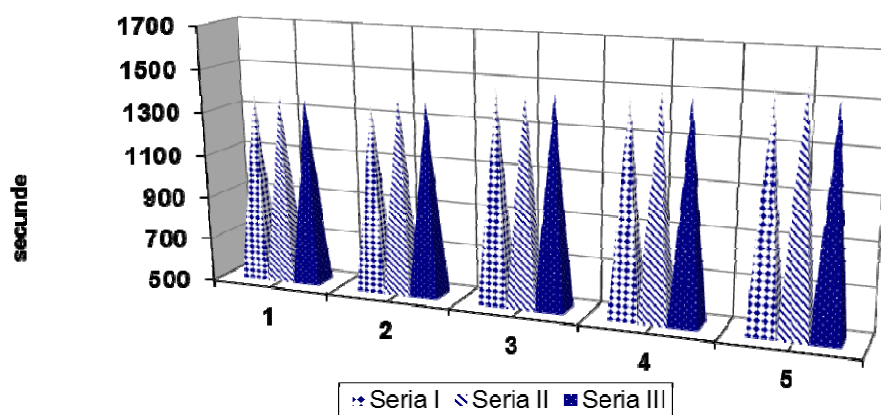


Fig. 19. Capacitatea de curgere pentru 100 g probă de granulat/secunde.

În rezultatul studiului s-a înregistrat o curgere omogenă cu timpul maxim de 1560 secunde și timpul minim de 1359 secunde, observat în analiza probelor seriilor de granulate (Figura 19).

4. FORMULAREA ȘI STANDARDIZAREA COMPRIMATELOR. STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE ȘI TOXICITĂȚII ACUTE.

4.1. Formularea și studiul comprimatelor

Ca materie primă pentru formularea comprimatelor, a fost folosit granulat, cu conținut standardizat în principii active polifenolice și flavonoidice.

La prima etapă a fost obținut extractul fluid de anghinare cu raportul de materie primă/solvent 2:100. Extracția s-a realizat prin metoda cu ultrasunete la temperatura de 80°C, în calitate de extragent a servit etanolul de 70%, timpul de extracție a fost de 30 minute, frecvența - 30kHz. Dozarea principiilor active în extractul fluid a fost efectuată spectrofotometric [25]. Totalul polifenolic

exprimat în acid galic a fost de $0,70 \pm 0,069$ mg/ml și totalul flavonoidic exprimat în rutozidă – $0,25 \pm 0,0209$ mg/ml.

Ulterior, extractul fluid obținut, a fost supus procesului de uscare prin metoda de granulare în pat de aer fluidizat cu folosirea în calitate de excipienți celuloză microcristalină și lactoză monohidrat.

Rezultatele determinării cantitative a totalului polifenolic în recalcul la acid galic au fost de $0,75 \pm 0,08$ mg/0,1 g granulat, iar valoarea medie a conținutului totalului flavonoidic determinat în recalcul la rutozidă, a fost de $0,40 \pm 0,021$ mg/0,1 g granulat.

Pentru standardizarea comprimatelor cu conținut de PA extrase din *Cynarae folia* au fost formulate 3 loturi de comprimate obținute la mașina de comprimat cu excentric *Korsch EK* (Korsch, Germania). Formula comprimatelor este prezentată în Tabelul 2.

Pentru îmbunătățirea calității amestecului de comprimat s-au utilizat substanțe auxiliare precum stearatul de magneziu ca agent de glisare, talcul ca lubrifiant și amidon ca dezagregant.

Tabelul 2. Componenta pentru un comprimat

No	Denumirea materiei prime	Cantitatea, mg
1	Extract uscat standardizat de anghinare*	475,00
3	Stearat de magneziu	5,00
4	Talc	5,00
5	Amidon de cartofi	15,00
	Total	500,00

Notă* - extract uscat de anghinare sub formă de granulat, standardizat după conținutul totalului polifenolic ($0,75 \pm 0,08$ mg/0,1g granulat) și a totalului flavonoidic ($0,40 \pm 0,021$ mg/0,1g granulat); celuloză microcristalină 60% și lactoză monohidrat 40%.

Identificarea principiilor active din comprimate s-a efectuat cu aplicarea a 2 metode:

1. *metoda spectrofotometrică în UV* – s-a comparat spectrul UV al probei cercetate cu spectrul UV al soluției standard de acid clorogenic care se determină în regiunea de la 250 nm la 400 nm. A fost înregistrat maximul de absorbție la lungimea de undă 327 nm, iar la lungimea de undă 300 nm a fost observat un umăr (Figura 20).

2. *metoda CSS* - Spoturile principale de pe cromatograma soluției probă, trebuie să corespundă după valoarea R_f , dimensiunea și intensitatea culorii, cu spoturile de pe cromatograma soluțiilor standarde de acid clorogenic și luteolină-7-glucozid.

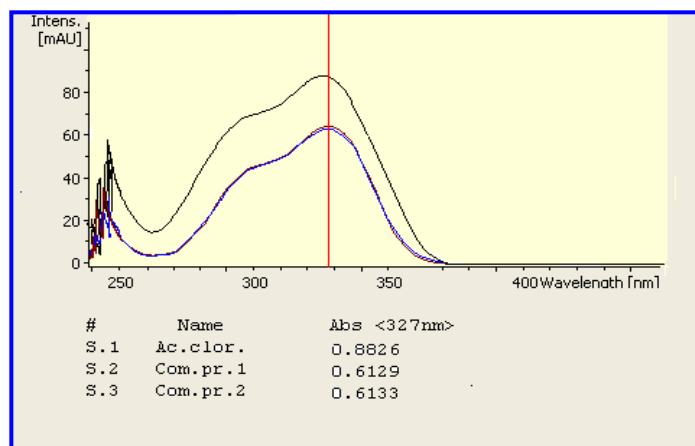


Fig. 20. Spectrul în UV al acidului clorogenic cu un maxim de absorbție la $\lambda 327 \pm 2$ nm.

Comprimatele au fost obținute prin presarea directă, având următorii parametri farmaceutici (Tabelul 3):

Tabelul 3. Rezultatele controlului farmaceutic al comprimatelor

	Seria I	Seria II	Seria III
Determinarea friabilității comprimatelor			
Număr de determinări	3	3	3
Masa pierdută, %	0,138±0,004	0,137±0,0044	0,141±0,0045
Determinarea timpului de dezagregare a comprimatelor			
Număr de determinări	3	3	3
Media timpului de dezagregare, minute	2,923±0,1318	2,542±0,1730	2,698±0,1491
Determinarea rezistenței mecanice			
Număr de determinări	10	10	10
Valoarea medie a rezistenței mecanice, Kg	6,0±0,1290	6,08±0,2006	6,16±0,2108

Testul de dizolvare a fost efectuat în mediu de apă distilată, prin metoda oficializată ”coșul rotativ”. Rezultatele testului de dizolvare peste 45 minute: pentru totalul polifenolic - 76,4%; pentru totalul flavonoidic - 77,1%, parametri ce se încadrează în cerințele farmaceutice pentru comprimate. A fost determinată cinetica de dizolvare a totalului polifenolic (Figura 21) și flavonoidic (Figura 22) din comprimate.

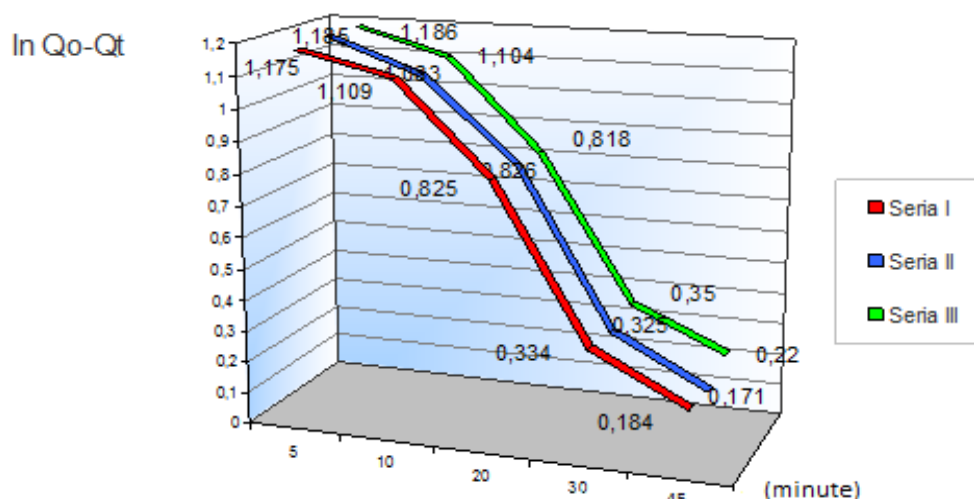


Fig. 21. Grafic semilogaritm (ln Qo-Qt) de dizolvare a totalului polifenolic.

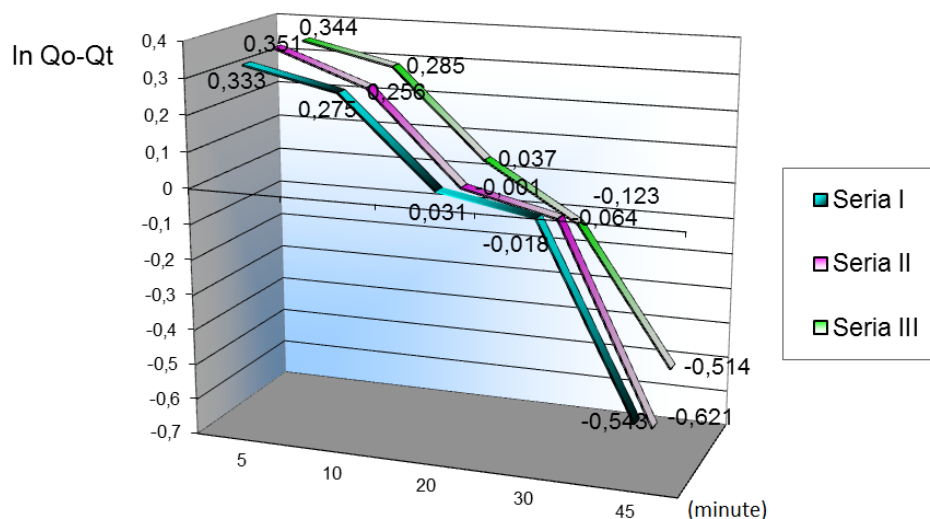


Fig. 22. Grafic semilogaritm (ln Qo-Qt) de dizolvare a totalului flavonoidic.

Dozarea principiilor active din comprimate. Dozarea totalului polifenolic s-a efectuat spectrofotometric la lungimea de undă 327 nm, în cuva cu grosimea stratului de 10 mm, utilizând în calitate de soluție blanc alcool etilic de 20%. Cantitatea totalului polifenolic în comprimat trebuie să fie cel puțin 3,0 mg și de cel mult 4,0 mg. Totalul flavonoidic a fost determinat la spectrofotometru la lungimea de undă de 430 nm într-o cuvă cu grosimea de 10 mm, utilizând soluția blanc: 5 ml soluție de clorură de aluminiu 2,5%, 7 ml de soluție de acetat de sodiu 10%, alcool etilic de 50% până la cota de 25 ml. Cantitatea totalului flavonoidic în comprimat trebuie să fie cel puțin 1,3 mg și cel mult 1,7 mg.

4.2. Studiu de stabilitate și standardizare a comprimatelor

Pentru validarea testului de stabilitate în condiții normale și de stres termic, au fost realizate studiile de stabilitate ale produsului „*Comprimate de anghinare, 5 mg*”, cu utilizarea a trei serii de comprimate conform programului stabilit.

Studiu de stabilitate în condiții normale. Programul pentru termen lung de studiu a stabilității a inclus testele realizate la temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$ și umiditatea relativă a aerului de $60 \pm 5\%$. Pentru evaluarea stabilității comprimatelor au fost determinați următorii indici de calitate: "Descriere", "Masa medie", "Uniformitatea masei", "Dezagregare", "Friabilitate", "Dozare" determinați cu frecvența din 3 în 3 luni la fiecare etapă a studiului, conform planului.

Determinările s-au efectuat paralel pentru toate trei serii. Pe perioada testărilor comprimatele și-au păstrat proprietățile fizico-chimice și au corespuns cerințelor atribuite calității în conformitate cu DAN. Rezultatele confirmă stabilitatea compușilor polifenolici și flavonoidici în comprimate pe perioada a 18 luni de păstrare. Conținutul totalului polifenolic ($3,5 \text{ mg} \pm 15\%$) și totalului flavonoidic ($1,5 \text{ mg} \pm 15\%$) prezintă valori încadrate în limita cerințelor FR X.

Testarea accelerată a stabilității. Studiul stabilității în condiții de stres termic sub influența ambalajului primar, în absența luminii, a fost testat pe durata a 6 luni la temperatura $40 \pm 2^\circ\text{C}$ și umiditatea relativă $75 \pm 5\%$. S-a demonstrat stabilitatea pentru toate trei serii de comprimate pe durata a 18 luni, temperatura de păstrare recomandată este sub $+25^\circ\text{C}$, ferit de lumină. *Studiile continuă.*

Validarea metodelor de dozare a principiilor active. Validarea metodelor analitice de dozare, utilizate pentru determinarea cantitativă a totalului polifenolic și flavonoidic în comprimatele cu conținut de extract din *Cynarae folia*, s-a efectuat în baza normelor ISO cuprinse în nota explicativă a Comisiei de specialitate a CE, în "Ghidul privind metodologia de validare a procedeeleor analitice – 3AQ14a" elaborat de ICH pentru înregistrarea medicamentelor de uz uman, ce include evaluarea parametrilor de validare și în USP 27-NF22, în care este inclus un ghid de linii directoare specifice pentru validarea metodelor utilizate pentru determinarea unor componente.

Validarea metodelor de dozare spectrofotometrice în UV și CLIP a principiilor active din anghinare prin determinarea selectivității, liniarității, exactității, preciziei, limitelor de detecție și cuantificare a demonstrat utilitatea folosirii acestor metode pentru dozarea totalului polifenolic și flavonoidic în comprimate.

În baza studiului efectuat au fost determinați principalii indici de calitate ai comprimatelor care au stat la baza întocmirii monografiei farmaceutice: „*Comprimate de anghinare, 5 mg*”.

4.3. Studiul activității antioxidante.

Determinarea activității antioxidante a speciei *C. scolymus* L. cultivată în condițiile pedoclimatice a RM s-a realizat în cadrul Laboratorului de Ficobiotehnologie a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe al RM.

În calitate de material pentru cercetare au servit extracte hidroetanolicе din frunze bazale, frunze tulpinale, tulpini, inflorescențe și bractee de anghinare, dar și granulat standardizat de anghinare.

Studiul activității antioxidante a avut drept scop evaluarea comparativă a capacității de scavenger a radicalilor liberi de către compușii biologic activi extrași din specia *C. scolymus* L.

În studiu s-au aplicat metode nespecifice, în baza reacțiilor de oxido-reducere cu utilizarea radicalilor non-biologici și metode specifice cu utilizarea, în calitate de substrat, a radicalilor specifici organismului uman [10].

Aplicarea metodelor nespecifice.

Metoda radicalului liber DPPH[•]. În rezultatul evaluării capacității antioxidante a extractelor din anghinare prin metoda radicalului DPPH[•] a fost stabilit IC₅₀ (μg/ml) pentru extractele din frunzele bazale (96,14±0,17 μg/ml), frunze tulpinale (125,82±0,22 μg/ml), tulpini (412,89±0,48 μg/ml), bractei (2182,68±0,65 μg/ml) și inflorescențe (6960,92±0,21 μg/ml). Valorile obținute demonstrează o capacitate antioxidantă foarte bună pentru frunzele bazale și tulpinale de anghinare, iar pentru extractele din bractei și inflorescențe activitatea antioxidantă s-a constatat a fi minimă.

Pentru granulate IC₅₀ constituie 142,03±0,04 μg/ml în comparare cu Trolox, I%= 90,60398 pentru concentrația de 25 μg/ml, DPPH[•] - 12,47%, valori ce denotă o activitate antioxidantă bună.

Metoda radicalului liber ABTS^{•+}.

Cea mai mică activitate antioxidantă a fost determinată pentru extractele obținute din bractei, valorile testului ABTS^{•+} fiind de 38% inhibiție. Rezultatele testului antioxidant ABTS^{•+} sunt prezentate în Figura 23.

Cele mai mari valori ale testului antioxidant ABTS^{•+} au fost înregistrate pentru extractele obținute din frunze bazale, frunze tulpinale și tulpini de *C. scolymus* L. Pentru granulat activitatea antioxidantă, determinată cu aplicarea testului ABTS^{•+} este de 49% inhibiție și se înscrie în limita valorilor determinate pentru extractele etanolice a produselor vegetale din frunze.

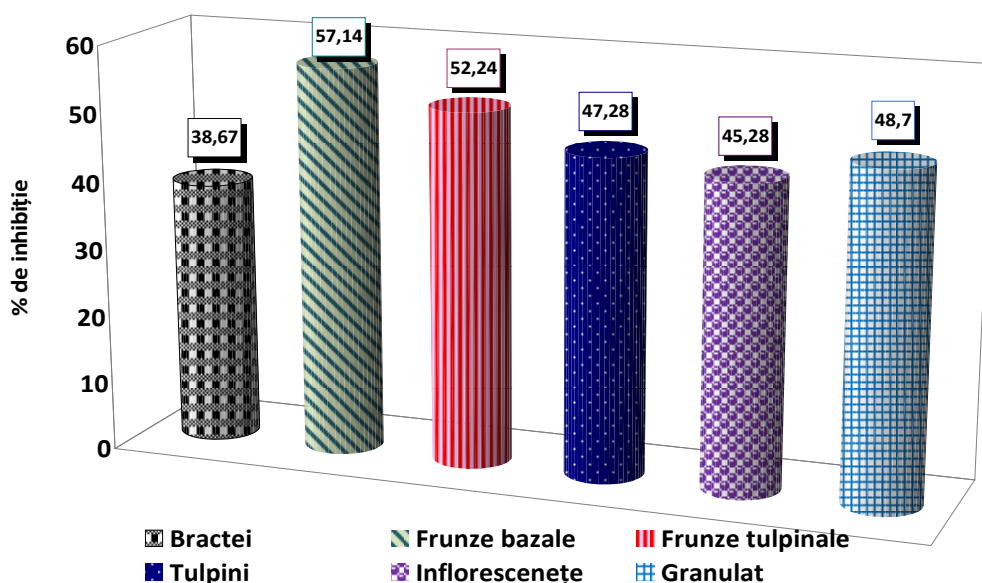


Fig. 23. Activitatea antioxidantă (I%) ABTS^{•+} a produselor extractive (1 mg/ml) din *Cynara scolymus* L.

Cele mai reprezentative valori ale testului ABTS^{•+} au fost obținute prin echivalentul TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) în care s-a stabilit faptul că 1 mg extract antioxidant, obținut din PV de frunze bazale și frunze tulpinale de *C. scolymus* L., posedă activitate antioxidantă echivalentă cu cea de 134-150 μM Trolox. Pentru extractele, obținute din tulpini și inflorescențe de *C. scolymus* L., indicele TEAC este de 112-118 μM Trolox. Activitatea antioxidantă pentru granulat, exprimată în valorile indicelui TEAC, este de 120 μM Trolox.

Evaluarea activității antioxidante cu aplicarea metodelor specifice.

Metoda de reducere a radicalului oxidului nitric NO[•]. Analiza datelor testului de determinare a capacității de reducere a oxidului nitric a stabilit o activitate antioxidantă sporită pentru toate tipurile de extracte. Valorile testului au prezentat valori minime de 5,2 μg echivalent acid ascorbic/mg substanță uscată pentru inflorescențe și bractei de anghinare. Activitatea extractelor din frunze de anghinare este și de data aceasta mai mare comparativ cu activitatea extractelor obținute din alte părți vegetale. Extractele etanolicе din frunze de anghinare (bazale și tulpinale) au cele mai mari valori ale testului de reducere a radicalului oxidului nitric - 6,0 μg echivalent acid ascorbic/mg substanță uscată.

Analiza granulatului prin metoda de reducere a radicalului oxidului nitric NO[•] a demonstrat capacitatea reducătoare a granulatului, având valoare medie de 6,4 μg echivalent acid ascorbic/mg.

Determinarea capacității de inhibiție a oxidării lipoproteinelor cu densitate joasă (LDL).

Lipoproteinele cu densitate joasă au fost obținute din serul sangvin prin metoda sedimentării cu heparină. Valoarea gradului de oxidare al LDL s-a determinat spectrofotometric, la lungimea de undă de 535 nm, prin concentrația substanțelor reactive ale acidului tiobarbituric cu dialdehida malonică (MDA).

În scopul comparării valorilor testului MDA, obținute cu aplicarea extractelor de anghinare în calitate de antioxidant al procesului de oxidare a LDL cu antioxidanți recunoscuți, a fost studiat efectul acidului ascorbic în concentrația de 1,0 mg/ml.

Rezultatele testului antioxidant, de supresare a oxidării LDL sunt prezentate în Figura 24. Rezultate obținute au stabilit că 17,5% din lipoproteine sunt oxidate în lipsa sulfatului de cupru, proba control negativ (Cu⁻) în condiții de 37°C timp de 24 ore.

Cea mai mare activitate în contracararea oxidării LDL a fost stabilită pentru probele cu aplicarea extractelor din frunze (60,8-61,6% inhibiție). Pentru extractele obținute din bractei și tulpini de anghinare, valorile testului MDA prezintă valori de 57,4% și 54,5% respectiv. Extractul din inflorescențe nu a manifestat efect antioxidant în condițiile de oxidare indusă a lipoproteinelor.

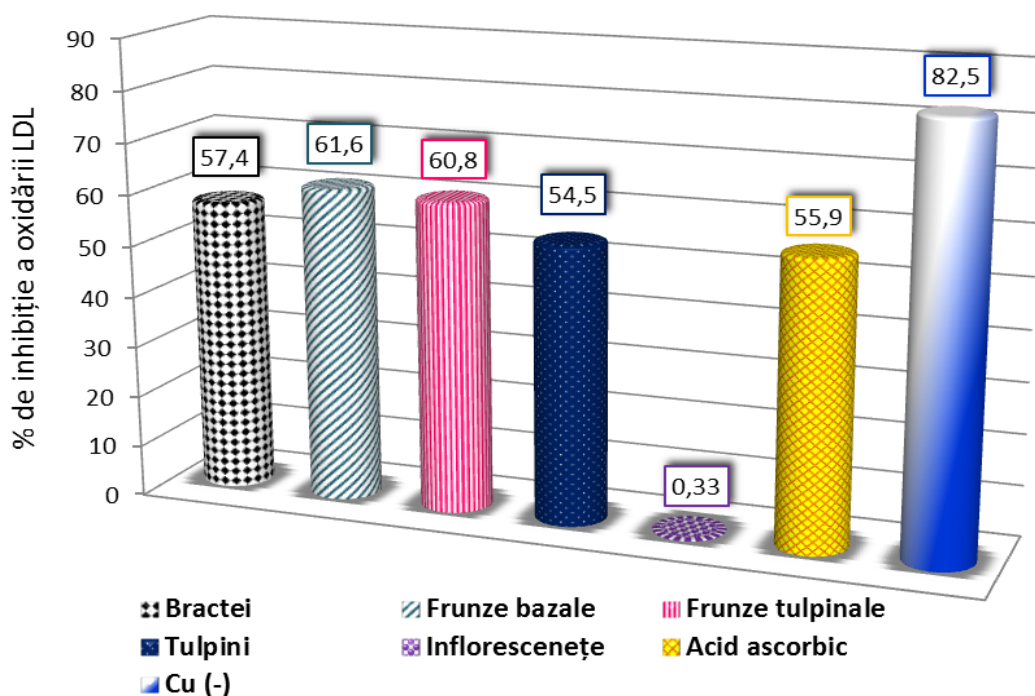


Fig. 24. Efectul de supresare a oxidării LDL (I %) determinat pentru extractele de *C. scolymus* L. 1 mg/ml substanță uscată.

Rezultatele testului de determinare a capacității de inhibiție a oxidării a LDL de către granulatul standardizat de anghinare au stabilit procentul de inhibiție a oxidării în limita de 59,5-59,9% (Figura 25).

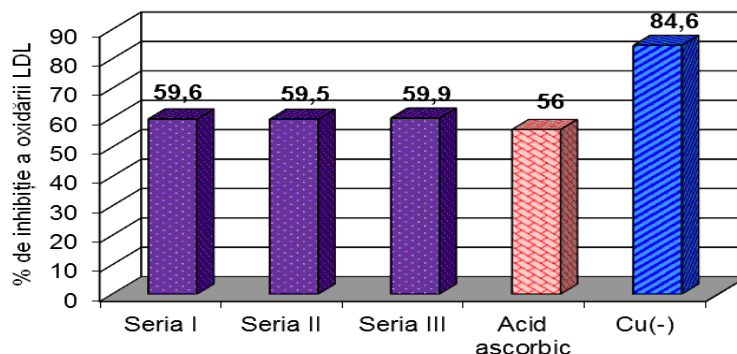


Fig. 25. Efectul de supresare a oxidării LDL (I%) a granulatului de anghinare 1 mg/ml.

4.4. Studiul toxicității acute.

Determinarea toxicității acute a granulatului cu conținut de extract standardizat în compuși polifenolici și flavonoidici din *Cynarae folia* s-a realizat în cadrul Laboratorului de cercetare morfo-funcțională a Universității Naționale de Farmacie din Harkov, Ucraina.

Toxicitatea acută a fost determinată conform „Recomandărilor metodice pentru studiul preclinic al substanțelor medicamentoase”, aprobate de Centrul de Stat de Farmacologie a Ministerului Protecției Sănătății din Ucraina în anul 2011, pe două grupe de animale: șoareci albi (masculi și femele) cu masa corporală între 18-26 g și șobolani (masculi și femele) cu masa corporală între 190-210 g. Masa corporală, vârsta și condițiile de viață a animalelor din laborator au corespuns cu cerințele recomandărilor metodice. Animalele au fost grupate omogen după masa corporală. Pentru studiul toxicității acute (după doza unică de administrare), granulatul a fost introdus sub formă de suspensie per os – intragastral cu ajutorul unei sonde metalice atraumatice timp de 40 minute: pentru șoareci în doză de la 900 mg/kg până la 5400 mg/kg corp; pentru șobolani - în doză de 1300 mg/kg până la 8000 mg/kg.

Rezultatele obținute privind toxicitatea acută conform dozei unice de administrare *per os* au stabilit LD 0% pentru doza de 5400 mg/kg (doza maximă administrată la șoareci) și 8000 mg/kg (doza maximă administrată la șobolani). Astfel, studiile au demonstrat faptul, că produsul farmaceutic studiat cu conținut de extract uscat din *Cynarae folia* recoltat în condițiile pedoclimatice ale RM, în conformitate cu clasificarea substanțelor toxice propuse de Sidorov K.K., la administrarea dozei unice orale, face parte din categoria de compuși cu toxicitate redusă (clasa IV).

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

1. În baza rezultatelor studiilor biometrice ale speciei *C. scolymus* L. și a studiilor fitochimice s-a identificat posibilitatea utilizării atât a frunzelor bazale, cât și a frunzelor tulpinale de anghinare în calitate de materie primă suplimentară pentru elaborarea formelor farmaceutice noi.

2. Determinarea calității produsului vegetal *Cynarae folia* (amestec fragmentat din frunze bazale și tulpinale) a inclus: *examenul micro- și macroscopic*, ce au evidențiat caracterele de diagnostic comune, dar și de diferențiere a dimensiunilor structurilor celulare; cercetarea *indicilor numerici*; *analiza calitativă*, cu aplicarea reacțiilor specifice de colorare și sedimentare și de CSS, în care s-au pus în evidență prezența grupelor de flavonoide (*flavone*, *flavonone*, *flavonoli*, *flavononoli*) și a constituenților fenolici (*rutozidă*, *cvercetozidă*, *acid cafeic* și *acid clorogenic*); prin *analiza*

cantitativă CLIP au fost identificați și dozați următorii compuși: acid clorogenic, acid cafeic, apigenină, luteolină, acid ferulic, acid p-cumaric și acid gentisic.

3. Au fost stabilite perioadele de recoltare a produsului vegetal cu conținutul maxim de PA: *faza de butonizare* - pentru conținutul maxim de flavonoide (20,08 mg/g - frunzele bazale și 19,15 mg/g - frunzele tulpinale) și *început de înflorire* - pentru conținutul maxim de polifenoli (52,66 mg/g - frunzele bazale și 44,32 mg/g frunze tulpinale).

4. Studiile de optimizare a metodelor de extracție au inclus aplicarea planurilor experimentale, în care s-a demonstrat conținutul cel mai sporit de principii active în extractele obținute prin metoda asistată de ultrasunete, în raportul PV: extragent - 2:100 și etanol 70%.

5. Folosirea tehnicii de granulare în pat de aer fluidizat a permis obținerea unui granulat standardizat în compuși polifenolici, determinați în recalcul la acid galic (0,75 mg/0,1 g granulat) și compuși flavonoidici, determinați, în recalcul la rutozidă (0,40 mg/0,1 g granulat), folosit la formularea și prepararea comprimatelor prin metoda de presare directă, cu parametri farmacotehnici, care se încadrează în cerințele farmaceutice pentru comprimate și cu metodele de dozare spectrofotometrice în UV și CLIP validate.

6. Determinarea *in vitro* a capacității antioxidante a extractelor din frunze bazale și tulpinale de anghinare, prin metode nespecifice: metoda DPPH[•] a stabilit IC₅₀ pentru frunzele bazale - 96,14 μg/ml, pentru frunzele tulpinale - 125,82 μg/ml; metoda ABTS^{•+}, prin echivalentul TEAC, a stabilit IC₅₀ la frunzele bazale - 150 μM Trolox, la frunzele tulpinale - 134 μgM Trolox; și metode specifice: metoda NO[•] a demonstrat valori de reducere a radicalului oxidului nitric în limitele 5,2-6,0 μg echivalent acid ascorbic/mg PV; metoda contracarării oxidării LDL - a stabilit procentul mediu de inhibiție pentru extractele din frunze de anghinare - 61,4%.

7. Studiul toxicității acute, la administrarea *per os* a unei doze unice de granulat standardizat, a determinat LD 0 % pentru doza maximă de 5400 mg/kg - administrată la șoareci și LD 0 % pentru doza maximă de 8000 mg/kg - administrată la șobolani, valori caracteristice pentru compuși cu toxicitate redusă (clasa IV).

8. În baza rezultatelor experimentale obținute au fost elaborate monografiile farmaceutice „*Frunză de anghinare, 50 g*”, implementată la întreprinderea farmaceutică autohtonă „Medfarma” S.R.L.; monografia farmaceutică și regulamentul tehnologic de producere pentru „*Comprimate de anghinare, 5 mg*”, implementate la întreprinderea farmaceutică autohtonă, ÎM „RNP Pharmaceuticals” S.R.L.

În temeiul rezultatelor obținute se înaintează următoarele **recomandări**:

1. Introducerea în cultură, în arealul natural al RM, a speciei *C. scolymus* L., pentru obținere cantitativă și calitativă de produs vegetal autohton.
2. Pentru întreprinderile de elaborare și fabricare a produselor farmaceutice de origine vegetală recomandăm utilizarea produsului vegetal *Cynarae folia* alcătuit atât din frunze bazale cât și tulpinale, caracterizate cu un conținut înalt de principii active fenolice.
3. Se recomandă colectarea diferențiată a frunzelor în funcție de acumularea maximă a principiilor active în produsul vegetal *Cynarae folia* determinat în faza de butonizare și început de înflorire a plantei.
4. Schema tehnologică de obținere a granulatului, în baza extractului fluid de anghinare, poate fi recomandată în calitate de model pentru alte forme farmaceutice de origine vegetală.
5. Rezultatele experimentale și aspectele metodologice obținute și expuse în teză se recomandă a fi utilizate în instruirea studenților la disciplinele farmacognozie, botanică farmaceutică și tehnologie farmaceutică industrială, rezidenților facultății de farmacie și în cadrul perfecționării tematică a farmaciștilor la ciclurile „Actualități în Tehnologia farmaceutică” și “Utilizarea plantelor medicinale și a fitopreparatelor autorizate în Republica Moldova”.

BIBLIOGRAFIE

1. Leucuța Sorin E. ș.a. Tehnologie farmaceutică industrială: procedee de laborator. Cluj-Napoca: Editura Medicală Universitară „Iuliu Hațieganu”, 2010. p 84-144.
2. Popovici Iu., Lupuleasa D. Tehnologie farmaceutică. Iași: Polirom, 2009, vol. 3, p. 358-555.
3. Roman L., Bojiță M., Săndulescu R. Validarea metodelor de analiză și control. Bazele teoretice și practice. Cluj-Napoca: Ed. Medicală, 1998. p. 75-128.
4. Флоря В., Доня В. Культура лекарственных растений. Акад. Наук Молдовы, Ин-т Генетики и Физиологии растений, Гос. Аграр. Ун-т Молдовы. Chișinău: Bons Offices, 2010. p. 38-46.
5. Bombardelli E, Carai MA. Evidence of glycemia lowering effect by a *Cynara scolymus* L. extract in normal and obese rats. In: Phytother. Res., 2011, vol. 25(3), p. 463–466.
6. Bundy R. et al. Artichoke leaf extract (*Cynara scolymus*) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: a randomized, double blind placebo controlled trial. In: Phytomedicine, 2008, vol. 15(9), p. 668–675.
7. Coloru G., Alamanni M., Cossu M. Antiradical and antioxidant properties of Sardinian spiny artichoke (*Cynara scolymus* L.) var., following treatments for conservation and treatments. In: Rivista di Scienza dell'Alimentazione, 2005, nr 3, p. 53–60.
8. El-Abagy H. et al. Physiological and biochemical effects of some bioregulators on growth, productivity and quality of artichoke (*Cynara Scolymus* L.). In: Plant Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2010, vol. 6(6), p. 683-690.
9. European Pharmacopeia 7.0, Artichoke leaf dry extract *Cynarae folii extractum siccum*, 01/2010, p. 2389–2391.
10. Fratianni F. et al. Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.)). In: J. Food Chem. 2007, vol. 104 (3), p. 1282–1286.
11. Georgieva G. et al. Radical scavenging capacity of seeds and leaves ethanol extracts of *Cynara scolymus* L.– a comparative study. In: Mol. Biol., 2011, vol. 6(7), p. 151–155.
12. Juzyszyn Z. et al. The effect of artichoke (*Cynara scolymus* L.) extract on respiratory chain system activity in rat liver mitochondria. In: Phytother. Res., 2010, vol. 24(2), p. S123–S128.
13. Kukić J. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. In: Food Chem., 2008, vol. 107(2), p. 861–868.
14. Kulza M. et al. Development and validation of method for the determination of cynarin, luteolin in plasma. In: Przegl. Lek., 2012, vol. 69(10), p. 987–991.
15. Küskü-Kiraz Z. et al. Artichoke leaf extract reduces oxidative stress and lipoprotein dyshomeostasis in rats fed on high cholesterol diet. In: Phytother. Res., 2010, vol. 24(4), p. 565–570.
16. Lombardo S. et al. Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.). In: Food Chem., 2010, vol. 119(3), p. 1175–1181.
17. Miccadei S. et. al. Antioxidative and apoptotic properties of polyphenolic extracts from edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.) on cultured rat hepatocytes and on human hepatoma cells. In: Nutr. Cancer, 2008, vol. 60(2), p. 276–283.
18. Mileo A. et al. Artichoke polyphenols induce apoptosis and decrease the invasive potential of the human breast cancer cell line MDA-MB23. In: J. Cell Physiol., 2012, vol. 227(9), p. 3301–3309.

19. Nassar M. Chemical constituents and anti-ulcerogenic potential of the scales of *Cynara scolymus* (artichoke) heads. In: J. Sci. Food Agric., 2013, vol 93(10), p. 2494–2501.
20. Negro D. et al. Polyphenol compounds in artichoke plant tissues and varieties. In: J. Food Sci., 2012, vol. 77(2), p. C244–C252.
21. Orlovskaya T. et al. Chemical composition of *Cynara scolymus* leaves. In: Chemistry of Natural Compounds, 2007, vol. 43(2), p. 239-240.
22. Pandino G. Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. In: Food Chem., 2011, vol 126, p. 417–422.
23. Rondanelli M. et al. Beneficial effects of artichoke leaf extract supplementation on increasing HDL-cholesterol in subjects with primary mild hypercholesterolaemia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. In: Int. J. Food Sci. Nutr., 2013, vol 64(1), p. 7–15.
24. Schütz K. et al. Quantitative determination of phenolic compounds in artichoke-based dietary supplements and pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. In: J. Agric. Food Chem., 2006, vol. 54(23), p. 8812–8817.
25. Singleton V., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Method. Enzymol., 1999, nr 299, p. 152-178.
26. Vamanu E. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extracts of *Cynara scolymus* (*Cynarae folium*, Asteraceae Family). In: Trop. J. Pharm. Res., 2010, vol. 10(6), p. 777–783.
27. Wittemer S. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans. In: Phytomedicine, 2005, vol. 12(1–2), p. 28–38.
28. Zapolska-Downar D. et al. Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. In: Life Sci., 2002, vol. 71(24), p. 2897–2908.
29. Woo M. et al. Spray dry technology. Singapore: W.R.W., vol. 1, 2010. p. 113-157.
30. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_HMPC_assessment_report/2011/12/WC500119940.pdf

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI

• Articole științifice din Registrul Național al revistelor de profil (cu categorii):

1. **Ciobanu Cristina**, Calalb Tatiana, Diug Eugen. Morfo-biometria plantelor de *Cynara scolimus* L., cultivată în colecția de plante medicinale a Centrului de Cultivare a Plantelor Medicinale a USMF „Nicolae Testemițanu”. În: Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Chișinău, 2011, vol. 1, ediția XII-a, p. 431-436. Categoria C.
2. **Ciobanu Cristina**, Calalb Tatiana, Diug Eugen. Totalul polifenolic în produsul vegetal *Cynarae folia* recoltat în Republica Moldova. În: Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Chișinău, 2012, vol 1. ediția XI-a, p. 310-313. Categoria C.
3. **Ciobanu Cristina**. Dinamica acumulării principiilor active în frunzele de *Cynara scolymus* L., cultivată în Republica Moldova. În: Buletinul Academiei de Științe. Științele vieții. Chișinău, 2015, vol. 1(325), p. 144-151. Categoria B.

4. **Ciobanu Cristina**, Diug Eugen, Calalb Tatiana, Tomuță Ioan, Achim Marcela. Optimizarea metodei de extracție cu ultrasunet a principiilor active din specia *Cynara scolymus* L. În: Curierul Medical. Chișinău, 2015, vol. 58(2), p. 23-28. Categoria B.

• **Materiale/teze la forurile științifice internaționale (peste hotare):**

5. **Чобану Кристина**. Морфо-анатомическое строение листьев артишока (*Cynara scolymus* L.), выращенного в условиях Республики Молдова. В: «Modern Phytomorphology», Львов, Украина, 2012, том 2, с. 145–148.
6. **Ciobanu Cristina**. Determination of the total phenolic and total flavonoid contents in *Cynara scolymus* L. extracts. В: «Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии», Санкт-Петербург, Россия, 2012, том 10, № 2, с. 43.
7. **Ciobanu Cristina**. Biological aspects of *Cynara scolymus* L. cultivated in the Republic of Moldova. В: «Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии», Санкт-Петербург, Россия, 2012, том 10, № 2, с. 43.
8. **Чобану Кристина**. Листовая поверхность растения артишока колючего *Cynara scolymus* L., выращенного в условиях республики Молдовы. В: Материалы Международной научной конференции «Дендрология, цетоводство и садово-парковое строительство», посвященной 200-летию Никитского ботанического сада, Ялта, Украина, 2012, с. 236.
9. **Кристина К. Чобану**, Татьяна И. Калалб, Евгений М. Дюг. Сравнительный морфо-анатомический анализ прикорневых и стеблевых листьев артишока колючего, выращенного в условиях Республики Молдова. В: «Modern Phytomorphology», Львов, Украина, 2013, том 4, с. 165–167.
10. **Ciobanu Cristina**, Diug Eugen, Calalb Tatiana. Experimental design for artichoke's biologically active compounds extraction. В: «Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии», Санкт-Петербург, Россия, 2013, том 11, с. M23-24.
11. **Ciobanu Cristina**, Calalb Tatiana. Artichoke *Cynara scolymus* L. from the collection of the Centre for the cultivation of medicinal plants at the State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemitanu" from the Republic of Moldova. In: Acta Medica Marisiensis. Symposium Dedicated to the 65th Anniversary of the Botanical Garden of the University of Medicine and Pharmacy. Tirgu Mures, Romania, 2013, vol. 59, nr. 3, p. 10-11.
12. **Ciobanu Cristina**, Diug Eugen, Calalb Tatiana, Achim Marcela. The optimal recovery of phenolic compounds extracted from *Cynara scolymus* L. cultivated in the Republic of Moldova. В: «Хист», Черновцы, Украина, 2014, том 16, с. 326.

• **Materiale/teze la forurile științifice internaționale în republică:**

13. **Ciobanu Cristina**, Spataru Maria, Tihon Iurie. Comparative study of extraction techniques for *Cynara scolymus* L. cultivated in the Republic of Moldova. In: Abstract Book: MedEspera: 4th Intern. Medical Cong. for Students and Young Doctors. Chisinau, 2012, p. 32.
14. **Ciobanu Cristina**. Evaluation of phyto products obtained from artichoke *Cynara scolymus* L. on pharmaceutical market. In: Abstract Book: MedEspera: 5th Intern. Medical Cong. for Students and Young Doctors. Chisinau, 2014, p. 232.

• **Materiale/teze la forurile științifice naționale cu participare internațională:**

15. **Ciobanu Cristina**, Diug Eugen, Calalb Tatiana, Achim Marcela. Determinarea calității produsului vegetal *Cynarae folium*. In: Revista farmaceutică a Moldovei. Chișinău, 2014, nr 3-4, p. 70. Categoria C.

ADNOTARE

Ciobanu Cristina „Specia *Cynara scolymus* L. – sursă de noi produse farmaceutice”, teză de doctor în științe farmaceutice, Chișinău 2015. Teza este expusă în limba română cu titlul de manuscris pe 108 pagini text de bază tehnoredactate electronic și sub aspect structural constă din următoarele compartimente: introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări. Teza este ilustrată cu 32 tabele, 59 figuri, 17 anexe, indicele bibliografic enumeră 168 de surse. Rezultatele obținute sunt publicate în 15 lucrări științifice.

Cuvintele-cheie: *Cynara scolymus* L., *Cynarae folia*, anghinare, biometrie, macroscopie, microscopie, polifenoli, flavonoide, extracte fluide, granulat, extracție cu ultrasunete, granulare în pat de aer fluidizat, spectrofotometrie, cromatografie lichidă de înaltă performanță, optimizare, standardizare, validare, comprimate, antioxidant, toxicitate acută, documentație analitică de normare.

Domeniul de studiu: 316.01- Farmacie.

Scopul cercetării: studiul complex al speciei *C. scolymus* L. cultivată în condițiile pedoclimatice ale RM, identificarea și dozarea compușilor chimici, obținerea produselor extractive, evaluarea acțiunii biologice, obținerea și standardizarea formelor farmaceutice.

Obiectivele cercetării: studiul biometric, morfo-anatomic și fitochimic al speciei *C. scolymus* L.; evaluarea parametrilor de calitate pentru produsul vegetal; studiul dinamicii de acumulare a principiilor active; optimizarea obținerii și studiul produselor extractive din anghinare; formularea și standardizarea formei farmaceutice cu conținut de produs extractiv standardizat; studiul activității antioxidante în funcție de conținutul polifenolic și flavonoidic; determinarea toxicității acute a produsului extractiv standardizat de *Cynarae folia*; elaborarea Monografiilor Farmacopeice și Regulamentului Tehnologic privind produsul vegetal și forma farmaceutică.

Noutatea și originalitatea științifică. În premieră a fost studiată: biometria plantelor, macro- și microscopia frunzelor bazale și tulpinale ale speciei *C. scolymus* L., cultivată în condițiile pedoclimatice ale RM; optimizată obținerea extractelor standardizate din PV *Cynarae folia*; studiată acțiunea antioxidantă în dependență de conținutul polifenolic și flavonoidic; formulată compoziția comprimatelor cu conținut de extract standardizat; elaborată DAN la produs vegetal și comprimate.

Problema științifică soluționată constă în valorificarea speciei *C. scolymus* L. prin studiu biometric, morfo-anatomic, fitochimic, farmacotehnic și biologic în vederea elaborării documentației analitice de normare a calității și obținerii produselor farmaceutice standardizate: produs vegetal medicamentos și comprimate.

Semnificația teoretică constă în generalizarea studiului actual al cunoașterii despre specia *C. scolymus* L. și completarea tezaurului acesta cu noi aspecte referitor la biometria plantei, principiile de extracție a compușilor chimici și obținerea formelor farmaceutice în baza acestora.

Valoarea aplicativă a lucrării. Rezultatele actualei cercetări pot servi la introducerea în cultură a speciei *C. scolymus* L. în vederea obținerii materiei prime locale pentru fabricarea produselor farmaceutice cu conținut de compuși polifenolici și flavonoidici.

Implementarea în practică a rezultatelor cercetării. În baza rezultatelor experimentale obținute au fost elaborate monografiile farmacopeice „*Frunză de anghinare, 50 g*” – implementată la întreprinderea farmaceutică autohtonă „Medfarma” SRL; monografia farmacopeică „*Comprimate de anghinare, 5 mg*” și regulamentul tehnologic de producere „*Comprimate de anghinare, 5 mg*” - implementate la întreprinderea farmaceutică autohtonă ÎM „RNP Pharmaceuticals” SRL.

АННОТАЦИЯ

Чобану Кристина «Вид *Cynara scolymus* L. - источник новых лекарственных форм», диссертация на соискание учёной степени доктора фармацевтических наук, Кишинёу 2015. Диссертация изложена на 108 страницах основного текста и включает в себя введение, 4 главы, выводы и рекомендации, библиография из 168 источников, 32 таблицы, 59 рисунков, 17 приложений. Результаты исследований опубликованы в 15 статьях.

Ключевые слова: *Cynara scolymus* L., *Cynarae folia*, биометрия, макроскопия, микроскопия, фенольные соединения, флавоноиды, экстракты, гранулят, ультразвуковая экстракция, гранулирование в кипящем слое, спектрофотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, оптимизация, стандартизация и валидация, таблетки, стабильность, антиоксиданты, острая токсичность, аналитическая нормативная документация.

Специальность: 316.01 - Фармация

Цель исследования: комплексное исследование вида *C. scolymus* L., выращенного в климатических условиях Республики Молдова; качественное и количественное определение химических соединений; оптимизация получения экстрактивных веществ; изучение антиоксидантной активности; разработка, анализ и стандартизация твердых лекарственных форм – таблеток.

Задачи исследования: биометрическое исследование *C. scolymus* L.; макро- и микроскопическое исследование *Cynarae folia*; оценка качества лекарственного растительного сырья; оптимизация методов экстракции и разработка способа получения и стандартизация экстракта жидкого из артишока; исследование антиоксидантной активности в зависимости от содержания полифенолов и флавоноидов; разработка и стандартизация лекарственных средств, содержащих стандартизированный экстракт; определение острой токсичности; составление нормативно-аналитической и технической документации.

Научная новизна и оригинальность. Впервые были исследованы морфо-анатомические особенности прикорневых и стеблевых листьев артишока, были проведены исследования по оптимизации процесса экстракции с использованием факторных экспериментальных планов при получении стандартизированных экстрактов из *Cynarae folia*; была изучена антиоксидантная активность в зависимости от содержания полифенолов и флавоноидов; впервые были сформулированы таблетки из стандартизированного жидкого экстракта артишока колючего, выращенного в климатических условиях страны.

Научная проблема состоит в выявлении значимости вида *C. scolymus* L. в ходе биометрических, морфо-анатомических, фитохимических, биологических исследованиях и комплексном фармацевтическом исследовании лекарственных форм с целью составления нормативно-аналитической и технической документации и обеспечения надлежащего качества как условие для их регистрации.

Теоретическая значимость диссертации заключается в обобщении знаний о виде *C. scolymus* L. и с последующими исследованиями для получения фармацевтических форм на основе лекарственного растительного сырья - листья артишока колючего.

Прикладное значение работы. Результаты данного исследования могут служить для введения в культуру вида *C. scolymus* L. с целью получения новых лекарственных форм, содержащих фенольные соединения.

Практическая реализация результатов исследования. На основе полученных экспериментальных результатов были разработаны фармакопейные статьи «Листья артишока, 50 г» и «Таблетки из артишока, 5 мг», которые были внедрены в предприятие ООО "Medfarma" и ООО „RNP Pharmaceuticals”.

ABSTRACT

Cristina Ciobanu "Species *Cynara scolymus* L. - source of new pharmaceuticals", PhD thesis in pharmacy, Chisinau 2015. The thesis has 108 pages of basic text and consists of the following sections: introduction, four chapters, conclusions and recommendations. The thesis is illustrated with 32 tables, 59 figures, 17 appendices, 168 bibliographic sources. The results are published in 15 scientific papers.

Keywords: *Cynara scolymus* L., *Cynarae folia*, biometrics, macroscopy, microscopy, polyphenols, flavonoids, fluid extracts, granulation, ultrasonic extraction, spray drying granulation, spectrophotometry, high performance liquid chromatography, optimization, standardization, validation, tablets, stability, antioxidant, acute toxicity, analytical normative documentation.

Field of study: 316.01-Pharmacy

The purpose of the thesis consists in complex study of the species *C. scolymus* L. cultivated in the Republic of Moldova, qualitative and quantitative determination of chemical compounds, obtaining extractive products, evaluation of biological activity, obtaining and standardization of pharmaceutical solid forms.

The objectives of the paper: biometric study of *C. scolymus* L; macroscopic and microscopic study of *Cynarae folia*; quality assessment of *Cynarae folia*; dynamic accumulation of active principles; obtain and study the optimization of extractive products from artichokes; study of antioxidant activity according to polyphenol and flavonoid contents; formulation and standardization of pharmaceutical products containing standardized liquid extract; determine the acute toxicity of the extracts obtained from *Cynarae folia*; development of pharmacopoeia monographs and technological regulations of pharmaceutical production.

Novelty and scientific originality. For the first time were evaluated biometric, macro- and microscopic artichokes grown in the climatic conditions of the country; were applied experimental design plans for phenolic compounds extraction optimization; was studied the antioxidant activity of whole plant; were formulated tablets with standardized extract.

The scientific problem consists in emphasizing the species *C. scolymus* L. by biometric study, morphological and anatomical, phytochemical, biological pharmacotechnical and to develop analytical documentation of quality standards for artichoke leaves and artichoke tablets.

The theoretical significance of the thesis consists in the current state of knowledge about the species *C. scolymus* L. and supplementing them with new treasury issues relating to plant biometrics, principles of chemical compounds extraction and obtaining of pharmaceutical forms out of them.

The value of work. The results of the current research can serve in introducing to cultivation of *C. scolymus* L. and in obtaining pharmaceutical products with local raw materials standardized in polyphenolic and flavonoid content.

Practical implementation of the research results. Based on experimental results were developed the pharmacopoeia monographs "Artichoke leaves, 50 g", approved by pharmaceutical manufactory "Medfarma" PLC; pharmacopoeia monograph "Artichoke tablets, 5 mg", technological and production rules of "Artichoke tablets, 5 mg" approved by pharmaceutical manufactory "RNP Pharmaceuticals" PLC.

CIOBANU CRISTINA

**SPECIA *CYNARA SCOLYMUS* L.–
SURSĂ DE NOI PRODUSE FARMACEUTICE**

316.01 – FARMACIE

Autoreferatul tezei de doctor în științe farmaceutice

Aprobat spre tipar 05.06.2015
Hârtie ofset. Tipar ofset
Coli de tipar: 2,0

Formatul hârtiei 60x42 1/16
Tiraj 50 ex.
Comanda Nr. 586

*Tipografia „Europres” SRL
Mun. Chișinău, str. Maria Lătărețu, 32*