



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENTIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00688**

(22) Data de depozit: **28.09.2012**

(41) Data publicării cererii:  
**30.09.2013** BOPI nr. **9/2013**

(71) Solicitant:  
• **BIOTEHNOS S.A., STR. GORUNULUI NR. 3-5, OTOPENI, IF, RO**

(72) Inventatori:  
• **ZGLIMBEA LENUȚA, STR. DREPTĂȚII NR. 8, BL. O 10, SC. 1, ET. 7, AP. 48, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **DUMITRIU BRÂNDUȘA, STR. IONESCU SISEȘTI NR. 123A, BL. 1, SC. 1, ET. 3, AP. 8, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **ENE MANUELA DIANA, STR. CERNIȘOARA NR. 46, BL. P18, SC. 3, ET. 4, AP. 48, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **OLARIU LAURA, BD.ION MIHALACHE NR.42-52, BL.35, SC.B, ET.10, AP.79, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **BUSE EMILIA, STR. VALEA CĂLUGĂREASCĂ NR. 4, BL. 5, SC. C, ET. 2, AP. 37, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **DINCĂ GABRIELA, STR. DIMITRIE GROZDEA R. 10, BL. 82, SC. 1, ET. 1, AP. 6, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **DRUMEA VERONICA, STR. UNIRII NR.15, BRĂNEȘTI, IF, RO**

### (54) ASOCIERI FITOTERAPEUTICE ÎN PREVENIREA ȘI TRATAMENTUL ÎMBĂTRÂNIRII CUTANATE, CU EFECT DE REFACERE A STRUCTURILOR DERMO-EPIDERMICE AFECTATE

#### (57) Rezumat:

Invenția se referă la un produs fitoterapeutic utilizat în dermatologie. Produsul conform invenției este constituit, în procente masice, din 0,01...0,5% extract de *Salvia officinalis*, 1...5% extract de *Medicago sativa*, 0,5...1,5%

extract de *Viola tricolor* și ingredienți uzuali pentru condiționare.

Revendicări: 9

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



121  
120

## ASOCIERI FITOTERAPEUTICE IN PREVENTIA SI TRATAMENTUL IMBATRANIRII CUTANATE, CU EFECT DE REFACERE A STRUCTURILOR DERMO-EPIDERMICE AFFECTATE

Prezenta inventie se refera la produse fitoterapice cu actiuni complementare: estrogen-mimetica, de accelerare a turn-overului celular si proteic, de remodelare a cicatrizariei imperfecte, antioxidantă, antiinflamatoare fata de radiatia UV, asociate in preventia si tratamentul imbatranirii si al proceselor conexe de degradare a tesutului cutanat.

In scopul cumularii actiunilor ce converg la protectia completa fata de imbatranirea cronologica sau foto-imbatranire, si al obtinerii unor preparate de tip cosmeceutic cu eficacitate terapeutica demonstrata, fara a contine substante active medicamentoase recunoscute, brevetul de inventie propune asocierea principiilor active izolate din urmatoarele plante: *Salvia officinalis*, *Callendula officinalis*, *Trifolium pratense*, *Viola tricolor* si *Medicago sativa* si anume:

- extract denumit **Dermo U** izolat din **Folium Salviae**, sub forma de pulbere purificata cu un continut 100% acizi triterpenici, format din minim 80% acid ursolic si max.20% acid oleanolic, hidroxiursolic, hidroxioleanolic, betulinic, dehidrobetulinic, obtinut in cantitate de 0,5-1 g/100 g planta;
- extract denumit **Dermo O**, sub forma de pulbere purificata cu un continut 100 % acid oleanolic, obtinut in urma hidrolizei preparatului de saponine triterpenice Dermo Oz, extrase din **herba de Calendula** obtinut in cantitate de 0,4-0,6 g/100 g planta;
- extract denumit **Dermo Oz** izolat din **herba de Calendula**, sub forma de pulbere galben cafenie nehigroscopica cu un continut de saponine triterpenice ale acidului oleanolic de 50-70 %, obtinut in cantitate de 2-4 g /100 g planta;
- extract selectiv denumit **Dermo ET**, izolat din **Herba Trifolii**, conditionat sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol , standardizat in compusi flavonoidici exprimati in quercetina de min.0,15 g/100 mL si in agliconii izoflavonici de min.0,23 g/100 mL ca suma a daidzeinei, genisteinei, formononetinei si biochaninei A, determinata cantitativ prin HPLC si anume: daidzeina min.10 mg/100 mL, genisteina min.20 mg/100 mL, formononetina min.140 mg/100 mL si biochanina A min.60 mg/100 mL, obtinut in raport 2:1-1:1 planta: extract final;
- extract denumit **Dermo L**, izolat din **herba Medicago sp.** conditionat sub forma de extract fluid in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat in agliconi triterpenici

328 4119 187  
Bogdan  
Bogdan

OFICIU DE STAT PENTRU INVENTII SI MARCI
Cerere de brevet de inventie
Nr. a 2012 00688
Data depozit 28-09-2012

120  
121

1



AC  
119

hidrolizati exprimati in acid oleanolic de min.0,3% si in compusi flavonoidici exprimati in rutin de minim 0,15%, obtinut in raport 1:1-1:2 planta: extract final;

- extract denumit **Dermo -3FP**, izolat din **herba Viola tricolor** conditionat sub forma de extract fluid in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat in compusi flavonoidici exprimati in rutin de minim 1%, si in acizi polifenolcarboxilici exprimati in acid cafeic de minim 0,3%, obtinut in raport 1:1- 1:2 planta: extract final;

In cadrul procesului de imbatranire, au loc o serie de evenimente celulare si moleculare complexe si diferențiate in functie de agresiunea mediului extern (foto-imbatranire), dar si de specificitatea intrinseca a organismului respectiv (imbatranirea cronologica). **Proliferarea celulara** si corelarea ei cu diverse cai metabolice (Calciu intracelular, protein kinaza C) este un parametru relevant pentru studii de tip „anti-ageing” la nivelul pielii [1], fiind cunoscuta scaderea ratei de multiplicare si a turn-overului celular ale fibroblastului asociate cu imbatranirea.

Derma este alcătuită în mare parte din fibre de colagen și elastina. Fibrele groase de colagen susțin pielea. Fibrele de elastina sunt foarte flexibile și conferă rezistență mecanică și adaptabilitate la modificările conformatiionale pielii. Derma are o grosime mult mai mare decât epiderma (3-4 mm fata de doar cei 1,5 mm ai epidermei). Ea constă în mare parte din tesut conjunctiv, cunoscut și ca matrice extracelulară (ECM) secretată de fibroblasti. ECM-ul este alcătuit din 3 clase de biomolecule, cu o mare varietate de forme și marimi: proteine structurale: colagen și elastina, proteine specializate: fibrilina, fibronectina și laminina, proteoglicani. Cele mai abundente tipuri de colagen din piele sunt I și III; fibrele lor formează rețele responsabile de proprietățile mecanice ale pielii. Celelalte tipuri de colagen din piele sunt V, VI și XII și au rol de susținere. În tinerete predomină sinteza colagenului ca, după 40 de ani să domine degradarea lui. Prin urmare, pentru a menține un echilibru între sinteza și degradare, după o anumită varsta, trebuie stimulată sinteza colagenului și inhibată degradarea lui. [2]

Considerând că dominant în piele colagenul de tip I și III, se vor folosi agenti și tratamente pentru a **stimula sinteza acestor tipuri de colagen**. Un astfel de agent topic este vitamina C. De asemenea, se poate apela la **inhibarea degradării** colagenului ca metoda unică sau în conjuncție cu stimularea sintezei. Multe cercetări s-au axat pe gasirea unor inhibitori topici eficienți ai metaloproteinazelor (în particular: colagenaza), în timp ce modulatori la nivel molecular și chiar genic (ex. **activarea/ inhibitia expresiei TGF-beta**)

*[Handwritten signatures]*



2 8 -09- 2012

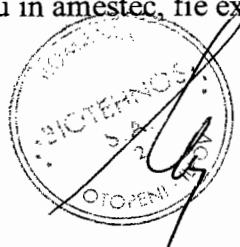
Hg  
118

reprezinta tinta cea mai recenta a formulelor inovatoare de dermatocosmetice anti-ageing. Un alt aspect important este **cicatrizarea imperfecta** dupa expunere solara sau traume minore, datorata depozitelor de colagen si elastina formate din fibre dezorganizate. Interventia terapeutica in acest caz trebuie sa aiba loc pe doua cai: **degradare enzimatica** a acestor aglomerari fibrilare sub **actiunea metaloproteinezelor activate** si **stimularea sintezei proteice** pentru regenerarea suportului structural din matrixul extracelular. Pe langa acest proces, recent a fost descoperit un mecanism convergent la nivelul **integrinelor  $\alpha 1\beta 1$  si  $\alpha 2\beta 1$**  cu rol in realizarea legaturilor celula – matricea proteica extracelulara, amplificarea expresiei acestora la nivel de fibroblast dermic sustinand restabilirea fermitatii pielii.

Pielea poate fi considerata o interfata intre corp si mediul inconjurator, actionand ca o bariera fata de efectele daunatoare ale agentilor fizici si chimici exogeni, inclusiv radiatia UV. [3] Stressul foto-oxidativ, originar din speciile de oxigen reactive formate in pielea expusa la soare reprezinta un mecanism patologic cheieavand consecinte atat la nivelul degradarii matricei extracelulare si formarea ridurilor, cat si in foto-mutageneza celulara implicata in carcinogeneza pielii. Foto-imbatranirea, cauzata de actiunea radiatiilor UV generatoare de radicali liberi la nivel celular are caracteristici fiziologice distincte fata de imbatranirea cronologica. Avand in vedere cele prezентate, una dintre actiunile tinta ale unui ingredient dermatocosmetic ar trebui sa fie cea de **reducere a stressului oxidativ celular si a reactiilor in lant declansate de acesta**: inducerea apoptozei, a secretiei citokinelor pro-inflamatorii, vascularizare aberanta promovata la nivel molecular de factorul VEGF. [4] Un alt aspect important in cadrul fenomenului de imbatranire il constituie depletia hormonala fiziologica (post-menopauza) sau in asociere cu patologii conexe. O noua tendinta a produselor de tip anti-ageing este aceea de a **actiona „estrogen-like”**, avand in vedere efectele fiziologice ale hormonilor sexuali (in special estrogenul) asupra pielii: stimularea sintezei si turn-overul colagenului, cresterea productiei de acid hialuronic, cresterea ratei mitotice a epidermei, etc.

Astfel, tinta biologica a ingredientelor dermatocosmetice de tip antiageing este multipla, pentru o actiune completa fiind necesara actiunea convergenta a mai multor principii active.

Din analiza datelor furnizate de literatura de specialitate au fost identificate si analizate o serie de brevete de inventie care trateaza rezolvarea problemelor majore ale imbatranirii tenului utilizandu-se principii active izolate din plante ca atare sau in amestec, fie exclusiv sau impreuna cu substante cosmetic active de sinteza. .



Unul din principiile active care face obiectul specialistilor din domeniul cosmetic il constituie **acidul ursolic**.

- Astfel, in brevetul de inventie KR20100060753 este revendicata o compositie cosmetica pe baza unui extract din radacina de Pfaffia glomerata, care prezinta un efect protector fata de deteriorarea sub influenta factorilor toxici si a stersului exterior, cu adaoi de pana la 10% de acid ursolic, oleanolic, betacaroten sau retinol.

- Jung Chang Jo s.a. revendica in brevetul de inventie KR20090038285 o compositie cosmetica obtinuta pe baza unui extract de Prunella vulgaris si frunza de Aloe Barbadensis ca principii active. Se mentioneaza ca extractul de Prunella vulgaris contine acid oleanolic si ursolic cu eficacitate demonstrata in hidratarea pielii

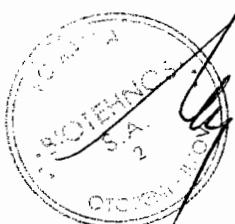
- Brevetul de inventie FR2885804 prezinta o compositie cosmetica cu efect de prevenire/intarziere a procesului de deteriorare cutanata datorita foto-imbatranirii, care are in compositie agenti antiinflamatori naturali, respectiv acid ursolic, ca inhibitor al elastazei leucocitare umane, alaturi de vitamina K, derivati ai vitaminei A si pseudopeptide. Testele de eficacitate in vitro au fost realizate prin incubarea unui esantion de elastaza din neutrofile umane timp de 10 minute cu un strat cromogen, valoarea inhibtiei a fost de 81-86% functie de concentratia acidului ursolic (0,004-0,01%).

- In brevetul EP 1327438 se revendica o formula cosmetica ce contine un amestec de acid ursolic si oleanolic pentru efectele antiinflamatoare impreuna cu flavonoide cu proprietati antioxidantane. Nu se dau date despre teste de evidentiere a actiunii dermatologice si mecanismele de actiune.

- Produsul de ingrijire al pielii imbatranite, ce face obiectul brevetului EP 1566170, are in compositie acid ursolic si/sau sarurile acestuia si un extract de Ginkgo biloba. Efectele se preconizeaza a fi cele cunoscute in literatura, de stimulare a microcirculatiei pentru extractul de Ginkgo, determinand cresterea penetrabilitatii acidului ursolic la nivelul pielii, pentru a stimula sinteza colagenului.

- In brevetul KR20060118792 este revendicata o compositie cosmetica pe baza de acid ursolic care, pe langa un puternic efect antirid, confera pielii sensatia de catifelare si umectare.

- In scopul reducerii ridurilor si a imbunatatirii texturii dermice, Cho Bylong Gi s.a. revendica, in brevetul de inventie KR20010094550 o compositie cosmetica care contine ca principii cosmetic active, pe langa acidul ursolic, si palmitoilpentapeptida sintetica, cu rol in maximizarea imbunatatirii calitatii pielii .



4

MF  
116

-In cererile de brevet de inventie DE102005026357 si DE102004050563 sunt revendicate compositii cosmetice de uz topic pentru tratarea imbatranirii pielii si a deregularilor de pigmentare, realizate dintr-o combinatie de principii active (acid ursolic, acid oleanolic,betaine naturale,flavonoide si isoflavonoide, derivati xantinici naturali, extracte de grau si ovaz, extract din vin rosu, seminte de strugure si ceai negru), care stimuleaza sinteza colagenului si asigura cresterea /imbunatatirea interactiunii intre matricea extracelulara si fibroblaste.

-Acidul ursolic este de asemenea recomandat pentru tratarea ridurilor fine impreuna cu retinolul, in cazul pielii fotoimbatranite conform brevetului de inventie KR20010057429.

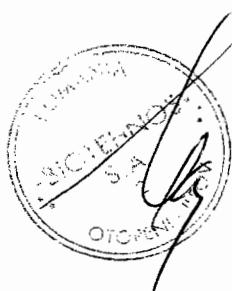
- Brevetul KR20000045576 propune o compositie cosmetica pe baza de extract de Crategus fructus, utilizata pentru prevenirea sau intarzierea imbatranirii pielii prin inlaturarea radicalilor liberi, conditionata ca lotiune, crema pentru masaj si crema nutritiva, unul dintre principiile active semnalate fiind acidul ursolic.

- Actiunea acidului ursolic de reconstructie a fibrelor de colagen este evidentiata si in brevetul de inventie JP2000178128, in scopul obtinerii unui produs cosmetic conditionat sub forma de crema, lotiune, emulsie.

-Actiunea sinergica a acizilor ursolic si oleanolic alaturi de retinol, de inhibare a diferentierii keratinocitelor este pezentata in brevetul de inventie RU2175546.

- Kitada Yoshiro s.a. revendica in brevetul de inventie JP11012122 un produs cosmetic destinat prevenirii sau reducerii efectelor imbatranirii asupra pielii , in special a efectelor fotoimbatranirii, prin intermediul unui amestec de ingrediente cosmetice activi cu actiune sinergica de impachetare a fibrelor de colagen dermic si cu actiune antiinflamatoare, ca de exemplu acid ursolic obtinut din plante din familia Rosacee, Rhamnacee sau Caprifoliacee alaturi de extract de Sanguisorba off, Artemisia capillaris, Fagara mantschurica sau acid salicilic.

- In scopul prevenirii efectelor fotoimbatranirii asupra pielii, se prezinta in brevetele de inventie TW541181 si JP914305 agenti de inhibare a efectelor de fotoimbatranire pe baza de derivati triterpenici selectionati dintre acizii ursolic, oleanolic sau betulinic, precum si produsele cosmetice obtinute pe baza acestora, avand o actiune de prevenire si reducere a ridurilor. Testele realizate pe culturi celulare de keratinocite umane au urmarit cantitatea de transglutaminaza, marker al diferentierii keratinocitelor si cantitatea de DNA-indicator al numarului de celule.



AH  
MS

- In cererea de brevet de inventie US 20091016965 este revendicat un mod de actiune dual complementar, al unui amestec alcătuit din extract de cocos cu acid ursolic sau oleanolic. Efectul urmarit și evidențiat prin teste a fost anhialuronidasic.

- Kang și colaboratorii revendica în US 2010119628 o compozitie cosmetica ant-aging ce contine extract de Hibiscus esculentum și cel putin unul dintre acizii triterpenici: ursolic, oleanolic, glicirinetic și retinol. Efectul urmarit a fost de imbunatatire a aspectului ridurilor prin promovarea sintezei colagenului. Testarea in vitro de promovare a sintezei colagenului fibroblastilor s-a realizat doar cu extractul de Hibiscus. Testele clinice cu variante de compozitii cosmetice ce includeau si acizii triterpenici si retinolul s-au realizat pe grupuri de femei cu varsta intre 30-39 ani, au evidențiat imbunatatirea efectelor in cazul variantelor ce contin acid ursolic si/sau oleanolic.

Actiunea cosmetic activa a extractelor din **Viola tricolor** utilizate ca atare sau in amestec cu alte principii active naturale este de asemenea studiata in literatura de specialitate.

- Astfel, in brevetul de inventie KR20110023437 este prezentata o compozitie cosmetica care contine pe langa extractul de Viola tricolor, si extracte din Bellis Perennis, Calendula officinalis, Carthamus tinctoris si Geranium maculatum, iar actiunea declarata a acestui amestec este antioxidantă si de crestere a elasticitatii pielii.

- Produsul cosmetic care face obiectul revendicarilor brevetului de inventie JP2008037812 cu efect declarat antiimbatranire prin conferirea de elasticitate si fermitate pielii, are ca si constituenti extracte naturale obtinute din materii prime selectionate dintre Trifolium partense, Salvia officinalis, Camelia sinensis, Bellis perennis, Viola tricolor, Papaver Rhocas, Crategus oxyacantha, Hippophae Rhamnoides etc.

-Brevetul de inventie KR 960016197 revendica un agent natural de captare a radiatiilor UV ce consta dintr-un amestec de extract de cafea si un extract de Viola tricolor al carui component principal este un compus fenolic.

- Brevetul JP 2000159622 propune un preparat de uz extern, cu efect excelent de albire, avand o buna supresie a melaninei, ce contine un extract uscat obtinut din Viola tricolor.

- De asemenea in brevetul de inventie IL106288, este revendicata o compozitie cosmetica cu actiune de regenerare a pielii pe baza de extracte de Viola tricolor si Stellaria media.

- Extractul pe baza de Viola tricolor ca atare face obiectul mai multor brevete de inventie din care specificam KR100858449, KR20070121338 si JP5255060, fiind mentionate actiunile sale de promovare a sintezei enzimelor si receptorilor asociati cu acidul hialuronic, actiunea de umidificare dermica, prin inhibarea evaporarii la nivel ~~tegumentar~~, actiune antiinflamatoare si de imbunatatire a circulatiei la nivelul dermei.



MS  
119

O alta materie prima vegetala pentru obtinerea unor principii cosmetic active utilizate in produse antiimbatranire o constituie **Medicago sativa**.

-In acest sens, J. Paufique prezinta, in brevetul de inventie FR2945444, actiunea de stimulare a receptorului nicotinacetylcholinic al extractului de Medicago sativa, utilizat intr-un produs cosmetic alaturi de extractul de Oryza sativa testat pe cheratinocite umane., ca ingredient cosmetic activ.

- Tsuji Keiko s.a. revendica in brevetul de inventie JP2009221173 un ameliorator al statusului cheratinei pe baza de extract apos de Medicago sativa, utilizat in produse cosmetice in scopul imbunatatirii nivelului de apa legata al cheratinei, avand potential iritogen foarte redus.

-Produsul cosmetic care face obiectul brevetului de inventie JP2008247786 are ca ingredient activ un amestec de extracte din Medicago sativa si soiurile albe si rosii de Canavalia gradiata, cu actiune declarata de ameliorare a agregarii cheratinei din stratum corneum ceea ce determina proprietati excelente de mentinere a apei in tesutul pielii, alaturi de catifelarea acesteia, de cresterea gradului de transparenta si a stimularii pielii.

-De asemenea in brevetul de inventie FR2921836 se prezinta utilizarea ingredientilor cosmetic activi pe baza de Medicago sativa impreuna cu extractul de Lupus albinus in vederea prepararii unui produs cosmetic/dermofarmaceutic cu actiune de inhibare a enzimei de conversie a angiotensinei in proportie de 77%.

-In brevetul de inventie JP2008247787 este prezentat un extract apos pe baza de Medicago sativa cu efect de crestere a turn-overului stratului corneum, ceea ce permite o rapida indepartare a stratului corneum imbatranit prin indepartarea melaninei din acesta, ducand astfel la ameliorarea petelor pielii, si crescand gradul de transparenta al acesteia, avand de asemenea si un efect stimulator, proprietati care il recomanda pentru utilizari in produse cosmetice topice.

- Brevetul european EP1559417 revendica un ingredient activ cu efect anticearcan si proprietati de catifelare, recomandat pentru utilizarea in scopul combaterii efectelor imbatranirii pielii, obtinut din pulbere de seminte de Medicago sativa prin dizolvarea acesteia in mediul apos.

-In brevetul de inventie US6471972 in care se prezinta o compositie cosmetica noua utilizata pentru combaterea imbatranirii pielii, este specificata si sustinuta prin teste specifice actiunea de stimulare a sintezei de colagen IV a saponinelor extrase din radacini de Medicago sativa, actiune valorificata intr-o crema cosmetica pentru fermitate in vederea intrazierii aparitiei si a combaterii ridurilor.

*Logan*  
*Bogdan* *SBY*



H9  
113

-Brevetul de inventie WO9956712, in care este descris un proces de preparare a unui produs cosmetic si/sau farmaceutic cu actiune de stimulare a metabolismului cutanat, mentioneaza in acest sens, obtinerea unui extract din seminte germinate de *Medicago sativa* care poate fi utilizat in amestec cu alti aditivi in proportie de 0,01% in produse cosmetice antiimbatranire.

- Brevetul de inventie US5770223 prezinta utilizarea saponinelor extrase din frunze sau din radacini de *Medicago sativa* pentru prepararea de produse farmaceutice si/sau cosmetice in scopul combaterii efectelor de imbatranire a pielii prin incetinirea proceselor de diferentiere celulara a epidermei in special a cheratinocitelor.

Din analiza brevetelor de inventie care se refera la compositii cosmetice cu actiune antiageing care au in compositie extracte pe baza de ***Trifolium repens*** se mentioneaza brevetul KR20110090803 in care este prezentata o compositie cosmetica, care utilizeaza un extract din *Trifolium repens* sau sucul din aceasta planta, alaturi de alte extracte vegetale nementionate , in scopul reducerii ridurilor si a intrazierii instalarii semnelor de imbatranire a fetei.

- In brevetul de inventie JP2009001515 este prezentat un compus pe baza de isoflavone cu actiune de reglare estrogenica utilizabil in produse cosmetice, obtinut din flori, frunze sau seminte de *Trifolium repens*.maruntite impreuna cu fructe de *Ficus carica*

- Compozitia cosmetica care face obiectul brevetului de inventie JP2008037812 are ca ingredient activ si extractul de *Trifolium*, alaturi de frunze de *Camellia Sinensis*, *Salvia officinalis*, flori de *Rosa Gallica*, *Hibiscus*, *Bellis Perennis*, *Viola Tricolor*, fructe de *Hippophae rhamnoides*, *Zizyphus jujuba*, radacini de *Scutellaria baicalensis* etc.

- In brevetul de inventie JP2006241036 este revendicat un produs cosmetic anti-ageing cu efect declarat sinergic anti-rid, si care confera fermitate si elasticitate pielii imbatranite. Ingredientii cosmetic activi descriși sunt extractul de *Chlorella vulgaris*, promotor al sintezei de colagen, un agent estrogenic selectat din urmatoarele extracte: *Pueraria Radix*, *Pueraria mirifica*, *Trifolium pratense*, un compus neutralizant al substantelor oxigen active (*Sanguisorba off.*, *Moutan Cortex*, *Olea europea* frunze) si un agent antiinflamator pe baza de *Houttuynia cordata*, *Althea* si *Aloe Vera*.

- Brevetul de inventie WO002087533 prezinta utilizarea unui extract pe baza de *Trifolium* in produse cosmetice/dermatologice pentru tratamentul si profilaxia tulburarilor degenerative ale pielii.

-De asemenea, in brevetul de inventie WO9918927 este revendicat un produs de uz cosmetic si dermofarmaceutic avand ca ingredient activ un extract din *Trifolium* - fiind mentionate ca surse de materii prime varietatile *Trifolium subtessaneum*, *repens*. Extractul imita efectul unor



hormoni steroizi fiind recomandat a fi administrat in situatii de premenopauza in scopul imbunatatirii hidratarii, imbunatatirii tonusului pielii, al obtinerii unui aspect catifelat al acesteia.

Extractele pe baza de **Calendula officinalis** (galbenele) sunt de asemenea utilizate adesea in produse cosmetice.

-In acest sens, mentionam brevetul de inventie RU2008127894 in care se revendica un produs cosmetic pentru tratarea modificarilor pielii ca urmare a imbatranirii obtinut pe baza unui amestec de principii active naturale precum extractele de galbenele, lavanda, salvie, patrunjel in parti egale.

- Brevetul de inventie RO123162 se refera la compositii pe baza de plante cu actiune antirid avand in compositie *Calendula officinalis*, alaturi de *Urtica dioica*, *Rosmarinus officinalis*, *Glycyrrhiza glabra* si *Robinia pseudoaccacia*.

-Brevetul de inventie RO118256 prezinta o crema cosmetica antirid care contine, ca ingredienti activi, ulei de galbenele alaturi de extracte de Ginseng,, orez, ulei de avocado, ulei din germenii de grau. Actiunea declarata a produsului cosmetic asupra epidermei este regenerativa si hidratanta.

-In brevetul de inventie RO120314, Visan T.s.a. se refera la o compositie cosmetica pe baza de principii active vegetale pentru preventia si atenuarea ridurilor datorate imbatranirii in care utilizeaza extractul de galbenele alaturi de extractul de *Hypericum perforatum*, vitamina A si pantotenat de calciu.

- In brevetul de inventie RO119115, Ionescu C s.a. revendica o emulsie cosmetica cu actiune puternic regenerativa la nivelul celulelor cutanate, determinand o crestere a troficitatii pielii.

Din analiza datelor bibliografice legate de utilizarea extractelor pe baza de *Salvia officinalis*, *Callendula officinalis*, *Trifolium pratense*, *Viola tricolor* si *Medicago sativa* in compositii cosmetice cu actiune anti-ageing rezulta urmatoarele dezavantaje:

- Produsele obtinute in brevetele prezentate nu sunt standardizate in componente active si nu sunt prezentate date legate de compositia chimica, sau randamentele de obtinere ale acestora;
- Extractele utilizate ca ingredienti cosmetic activi sunt utilizate in compositii cosmetice antiimbatranire fie singular fie in combinatii , iar paleta de actiuni cosmetice acoperita este mult mai mica fiind de obicei unilaterală, astfel:
  - pentru **acid ursolic**: KR20100060753 protector fata de deteriorarea sub influenta factorilor toxici si a stersului exterior; KR20090038285 hidratarea pielii;

FR2885804 inhibitor al elastazei leucocitare umane; US 2010119628 ,EP 1566170 stimularea sintezei colagenului; efect antirid, catifelare si umectare; KR20010094550 reducerea ridurilor si a imbunatatirii texturii dermice;DE102005026357 si DE102004050563 stimularea sintezei colagenului si imbunatatirea interactiunii intre matricea extracelulara si fibroblaste; KR20000045576 prevenirea sau intarzierea imbatranirii pielii prin inlaturarea radicalilor liberi; RU2175546 inhibarea diferentierii keratinocitelor; JP11012122 actiune sinergica de impachetare a fibrelor de colagen dermic si antiinflamatoare;

- pentru extractul din **Viola tricolor** ce actioneaza in amestec cu alte extracte: KR20110023437 antioxidant si de crestere a elasticitatii pielii;JP2008037812 antiimbatranire prin elasticitate si fermitatea pielii; KR 960016197 captarea radiatiilor UV; JP 2000159622 efect de albire; IL106288, regenerarea pielii ;KR100858449, KR20070121338 si JP5255060 sinteza enzimelor si receptorilor asociati cu acidul hialuronic, actiunea de umidificare, antiinflamatoare, imbunatatirea circulatiei;
- pentru extractul de **Medicago sativa**: US5770223, JP2009221173 ameliorator al statusului cheratinei; JP2008247786 ameliorare a agregarii cheratinei; FR2921836 inhibarea enzimei de conversie a angiotensinei; JP2008247787 cresterea turn-overului stratului corneum, indepartarea melaninei si ameliorarea petelor pielii; EP1559417 efect anticearcan si proprietati de catifelare; WO9956712 stimulare a metabolismului cutanat;
- pentru extractul de **Trifolium** ce actioneaza singur sau in amestec cu alte extracte : JP2006241036, KR20110090803 antiageing; WO9918927,JP2009001515 reglare estrogenica imbunatatinand hidratarea si tonusul pielii; WO002087533 tratamentul si profilaxia tulburarilor degenerative ale pielii;
- Extractele pe baza de **Calendula officinalis** in amestec cu alte extracte: RU2008127894 tratarea modificarilor pielii ca urmare a imbatranirii; RO118256, RO123162 antirid,regenerativa si hidratant; RO120314 regenerativa la nivelul celulelor cutanate, determinand o crestere a troficitatii pielii.
- Marea majoritate a actiunilor mentionate pentru extractele prezentate nu sunt sustinute de testari complete in vitro si in vivo ale efectelor anti-imbatranire declarate, cu mici exceptii: FR2885804, TW541181, JP914305, US 20091016965, US 2010119628,

**Brevetul rezova problema tehnica:**

- de utilizare a unor **fitocompusi, standardizati in mai multe componente active, cu actiuni biologice complementare, in vederea eficientizarii aplicatiilor terapeutice ale extractele vegetale finale si anume :**

-extract denumit Dermo U izolat din **Folium Salviae**, sub forma de pulbere purificata cu un continut 100% acizi triterpenici, format din minim 80% acid ursolic si max.20% acid oleanolic, hidroxiursolic, hidroxioleanolic, betulinic, dehidrobetulinic, obtinut in cantitate de 0,5-1 g/100 g planta;

- extract denumit Dermo O, sub forma de pulbere purificata cu un continut 100 % acid oleanolic, obtinut in urma hidrolizei preparatului de saponine triterpenice Dermo Oz, extrase din **herba de Calendula** obtinut in cantitate de 0,4-0,6 g/100 g planta;

- extract denumit Dermo Oz izolat din herba de Calendula, sub forma de pulbere galben cafenie nehigroscopica cu un continut de saponine triterpenice ale acidului oleanolic de 50-70 %, obtinut in cantitate de 2-4 g /100 g planta;

- extract selectiv denumit Dermo ET, izolat din Herba Trifolii, conditionat sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol , standardizat in compusi flavonoidici exprimati in quercetina de min.0,15 g/100 ml si in agliconii izoflavonici de min.0,23 g/100 mL ca suma a daidzeinei, genisteinei, formononetinei si biochaninei A, determinata cantitativ prin HPLC si anume: daidzeina min.10 mg/100 mL, genisteina min.20 mg/100 mL, formononetina min.140 mg/100 mL si biochanina A min.60 mg/100 mL, obtinut in raport 2:1-1:1 planta: extract final;

-extract denumit Dermo L, izolat din herba Medicago sp. conditionat sub forma de extract fluid in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat in agliconi triterpenici hidrolizati exprimati in acid oleanolic de min.0,3% si in compusi flavonoidici exprimati in rutin de minim 0,15%, obtinut in raport 1:1-1:2 planta: extract final;

- extract denumit Dermo -3FP , izolat din herba Viola tricolor conditionat sub forma de extract fluid in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat in compusi flavonoidici exprimati in rutin de minim 1%, si in acizi polifenolcarboxilici exprimati in acid cafeic de minim 0,3%, obtinut in raport 1:1- 1:2 planta: extract final;

- de valorificare ecologica a resurselor de plante medicinale, ce presupune cultivarea plantelor in sistem ecologic pentru obtinerea materiei prime vegetale necesare productiei de preparate fitoterapeutice;

Preparatele/ingredientele cosmetic active sunt standardizate in principiile active responsabile de actiunea biologica urmarita si dovedita prin teste specifice, in vitro;



- de obtinere a unei game cosmetice prin asocierea originala a preparatelor fitoterapeutice a caror actiune biologica dovedita prin teste specifice **cumuleaza efectele de refacere a structurilor epidermice si dermice** (prin **ansamblul de mecanisme** ce stimuleaza proliferarea celulara, sinteza de colagen si degradarea depozitelor fibrilare dezorganizate, expresia integrinelor  $\alpha 1\beta 1$  si  $\alpha 2\beta 1$  cu rol de adeziune celula-matrice extracelulara, diferentierea keratinocitelor si hidratarea epidermala), **cu activitatea estrogen-mimetica si cu protectia celulara fata de radiatia UV** (actiune antiapoptotica, antiangiogenica, antiinflamatoare si antioxidantă) si anume:

- Creme antiageing de zi si de noapte pentru grupa de varsta sub 45 ani, bazata pe asocierea dintre produsul fitoterapic **Dermo-U** din **Folium Salviae**, produsul fitoterapic **Dermo-3FP din herba Viola tricolor** si produsul fitoterapic **Dermo L**, izolat din **herba Medicago sp.** pentru crema de zi, respectiv **Dermo-U** din **Folium Salviae**, produsul fitoterapic **Dermo Oz** izolat din **herba de Calendula**, si **Dermo-3FP din herba Viola tricolor pentru crema de noapte**
- Crema antiageing de zi pentru grupa de varsta peste 45 ani bazata pe asocierea dintre produsul fitoterapic **Dermo ET**, izolat din **Herba Trifolii**, produsul fitoterapic **Dermo Oz** izolat din **herba de Calendula**, si produsul fitoterapic **Dermo-3FP din herba Viola tricolor**
- Balsam si gel aftershave cu efect complementar de incetinire a proceselor de imbatranire, bazat pe asocierea dintre **Dermo-U** din **Folium Salviae**, produsul fitoterapic **Dermo Oz** izolat din **herba de Calendula**, si **Dermo-3FP din herba Viola tricolor**
- Crema de maini cu efect reparator, bazata pe asocierea dintre produsele fitoterapice **Dermo Oz si Dermo-O** izolate din **herba de Calendula**
- Crema de remodelare post-traumatica (arsuri solare, rani minore de diferite etiologii), bazata pe asocierea dintre produsele fitoterapice **Dermo ET** izolat din **Herba Trifolii**, **Dermo-U** din **Folium Salviae**, **Dermo Oz** din **herba de Calendula** si **Dermo L** din **herba Medicago sp.**
- Emulsii de protectie solara cu diferiti factori de protectie, bazata pe asocierea dintre produsul fitoterapic **Dermo-O** din **herba de Calendula** si produsul fitoterapic **Dermo-3FP din herba Viola tricolor**
- Crema antiacneica de zi cu efect de remodelare cicatriciala, bazata pe asocierea dintre produsele fitoterapice **Dermo ET** izolat din **Herba Trifolii si Dermo Oz** din **herba de Calendula**.

Produsele obtinute conform prezentei inventii prezinta urmatoarele efecte cosmetic active:

- de **refacere a structurilor dermice si epidermice** in contextul procesului de imbatranire sau al vindecarii ranilor (accelerarea turn-overului celular si proteic, echilibrarea proceselor de sinteza si degradare a matrixului extracelular si consolidarea legaturilor celula - proteine structurale din matrice prin supraexpresia integrinelor, diferentierea keratinocitelor din stratul corneum),
- **hidratare**
- **estrogen-mimetic,**
- **antioxidant si antiinflamator**
- **protector celular fata de radiatia UV.**

TESTELE EFECTUATE ÎN VEDEREA EVIDENȚIERII ACTIVITĂȚII SPECIFICE ȘI EVALUĂRII APLICAȚIILOR ÎN TERAPEUTICĂ A COMPOVENTELOR COSMETIC ACTIVE OBTINUTE DIN *SALVIA OFFICINALIS*, *CALLENDULA OFFICINALIS*, *TRIFOLIUM PRATENSE*, *VIOLA TRICOLOR* SI *MEDICAGO SATIVA*

Demonstrarea efectelor biologice ale extractelor vegetale s-a realizat la nivel de celula tinta, pe linii celulare standardizate relevante pentru mecanismul studiat:

- **Efectul de refacere a structurilor dermice si cel estrogen-mimetic** s-a testat pe fibroblasti dermici umani (HS 27), principalul tip celular responsabil de sinteza proteinelor structurale din matrixul extracelular, si care exprima receptori pentru hormonii estrogeni.
- **Efectul de regenerare epidermala si cel fotoprotector** s-a demonstrat pe linia de keratinocite umane HaCaT, tip celular reprezentativ pentru primul strat al tesutului cutanat, cu functie de bariera fata de actiunea nociva a radiatiei UV.

**Keratinocitele din linia celulara HaCaT**, dupa 24h. de aderare, s-au tratat cu substantele de interes timp de 48h. S-au utilizat pasajele 57-63, linia celulara standardizata fiind una imortalizata. Mediul de cultura folosit a fost DMEM complet, cu supliment de glucoza (1.35g/L), 1%antibiotic / antimicotic, 10% ser fetal bovin.

**Linia celulara standardizata HS27** de fibroblasti dermici umani s-a utilizat intre pasajele 15-22. Testarea s-a realizat pe celule aderate timp de 48 h. in flask-uri de cultura de 12.5 cm<sup>2</sup>, in mediu Dulbecco's modified Eagle's medium continand 10% ser fetal bovin, 1% antibiotic/antimycotic si incubate la 37°C in atmosfera de 5%CO<sub>2</sub>. Actiunea substantelor s-a evaluat in functie de relevanta pentru tipul de test respectiv, fie in cinetica la 24h., 48h.si 72h, sau dupa 48h. de incubare. Martorul pozitiv pentru stimularea cresterii fibroblastilor a fost Vitamina C 10µM.

## I. Efectul de refacere a structurilor dermice indus de componentele cosmetic active

### Dermo-U, Dermo-O, Dermo-Oz

Efectul s-a evidențiat pe culturi de fibroblasti dermici umani (linie celulară selectivă pentru efectul urmarit), prin date complementare privind urmatoarele mecanisme:

- a) stimularea proliferării celulare,
  - b) modularea sintezei proteice și a activității metaloproteinazelor, precum și a TGF $\beta$ , proteina cheie în homeostază colagenului
  - c) expresia integrinelor  $\alpha_1\beta_1$  și  $\alpha_2\beta_1$  cu rol de adeziune celula-matrice extracelulară
  - d) expresia genelor responsabile de restructurația matrixului dermic
- a) Stimularea proliferării celulare**

Efectul asupra statusul proliferativ celular s-a testat prin 2 tehnici complementare de analiză: secvențialitatea ciclului celular și succesiunea generațiilor proliferative (citometrie în flux, marcare cu iodura de propidiu și respectiv CFSE - carboxy fluorescein diacetat succin imidil ester). Rezultatele s-au estimat ca Indice de Proliferare, respectiv suma procentelor de celule în fazele de multiplicare S și G2/M. calculate cu un soft de analiză specific (FACS Express V3 modulul DNA cell cycle și proliferare).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

	24 ore		48 ore		72 ore	
	LP.	% (S+G2/M)	LP.	% (S+G2/M)	LP.	% (S+G2/M)
Martor celular	2,58	30,04	2,41	26,30	3,05	7,21
Martor solvent	2,81	31,80	3,01	24,30	3,40	7,06
Dermo U 0,5 $\mu$ M	3,60	35,13	4,25	26,80	3,00	7,10
Dermo U 1 $\mu$ M	3,55	39,42	4,47	28,90	2,75	7,60
Dermo U 3 $\mu$ M	3,23	38,25	3,60	30,40	3,10	7,40
Dermo Oz 1 $\mu$ g/ml	2,62	30,20	3,17	20,32	2,80	8,64
Dermo Oz 5 $\mu$ g /ml	2,38	32,30	2,05	34,28	3,22	7,18
Dermo Oz 10 $\mu$ g /ml	2,46	33,20	2,01	19,95	3,35	7,23
Vitamina C 10 $\mu$ M	3,57	46,40	5,22	38,54	3,90	10,20

**DERMO U** acionează imediat asupra fibroblastilor dermici, fiind activ la 24h de tratare atât asupra proliferării celulare cat și asupra multiplicării ADN- ului. **DERMO-Oz**, are un interval de acțiune mai lent, începând cu 48h, care se menține și se amplifică în timp.

Efectul de stimulare a proliferării se evidențiază și prin următoarele parametri de funcționalitate celulară: **pH intracelular și potentialul membranar**. Nivelul pH-ului intracelular are o importanță considerabilă asupra vitalității și funcționalității normale a celulelor, prezintând valori crescute datorită activării transportului transmembranar Na $^+$ /H $^+$  la

2 8 -09- 2012

106

actiunea stimulilor mitogeni, corelate cu faza de sinteza ADN. Acest parametru functional analizat corelativ cu indicele proliferativ si nivelul de sinteza ADN al celulei aduce un suport semnificativ al activarii *in vitro* a metabolismului fibroblastilor dermali sub actiunea fitocompusilor pentru a dovedi, in mod sustinut, efectul *anti-aging*. Analiza pH-ului intracelular s-a efectuat prin marcare fluorescenta cu BCECF-AM (biscarboxietil carboxi fluoresceina) a carei intensitate de emisie este dependenta de pH, masuratorile efectuandu-se prin flow-citometrie si analizate ca raport intre intensitatea emisiei la 525nm/640nm. **Dermo-U 0,5  $\mu$ M** creste valoarea pH-ului intracelular la 7,61 vs 7,51 martor celular netratat ceea ce denota o usoara crestere a activitatii metabolice celulare corelata cu raspunsul proliferativ; **Dermo-O 5  $\mu$ M** creste valoarea pH intracelular la 7,76 vs 7,61 control; **Dermo-ET 1/500** creste valoarea pH intracelular la 7,63 vs 7,48 control, iar **Vitamina C 10 $\mu$ g/ml** creste valoarea pH intracelular la 7,70 vs 7,54 control, iar **Vitamina C 10 $\mu$ M** (martor pozitiv) determina cresterea valorii pHi fata de control. Cresterea pHi denota o activitate metabolica proliferativa strans relationata cu raspunsul stimulator asupra multiplicarii fibroblastilor (parametrii de proliferare celulara, sinteza colagen).

Un alt parametru de functionalitate celulara, analizat pentru a sustine si completa rezultatele privind progresia in fazele ciclului celular, este **potentialul transmembranar** cellular, care este determinat de gradientul de concentratie al ionilor de Na, K si Cl de o parte si cealalta a membranei celulare si pe de alta parte de activitatea pompelor dependente ATP-transportoare de ioni. Starea de hiperpolarizare celulara este asociata cu stagnarea ciclului cellular in fazele G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> si cu un continut transient de Ca<sup>2+</sup> intracelular scazut, in timp ce depolarizarea membranara este corelata cu proliferarea si diferenstierea celulara si cresterea transienta a Ca<sup>2+</sup>. Pentru analiza flow-citometrica a acestui parametru s-au folosit controale pozitive: valinomicina – ionofor selectiv pentru K, a carui adaugare in mediu determina hiperpolarizarea celulelor; gramicidina care depolarizeaza celulele in solutii cu concentratii ionice fiziologice. Distributia fluorescentei dietiloxacarbocianinei DiOC<sub>2</sub>(3) reflecta valorile potentialului membranar ca urmare a modificarilor de componitie ionica a mediului celular. Rezultatele obtinute reflecta depolarizarea semnificativa a membranei celulare indusa de **Dermo-U 0,5 $\mu$ M, 1 $\mu$ M si 3 $\mu$ M** si **Dermo-ET5 1/500 si 1/1000** -, precum si de **Dermo-Oz 5  $\mu$ g/ml**. Depolarizarea membranara indusa de fitocomplecsi poate fi relationata cu capacitatea acestora de a determina cresterea fazei S a ciclului celular, la aceleasi doze testate. Depolarizarea membranara indusa de compusii **Dermo-U, Dermo-Oz, Dermo-ET5** se poate corela cu valorile crescute ale pH –ului intracelular, acesta fiind influentat considerabil de concentratia ionilor determinanti de potential transmembranar.

**b) Modularea sintezei proteice si a activitatii metaloproteinazelor, precum si a TGF $\beta$ , proteina cheie in homeostazia colagenului**

**Modularea sintezei de colagen** de catre *Dermo U*, *Dermo Oz-8* si *Dermo O* a fost investigata prin dozarea hidroxiprolinei din mediul de cultura al fibroblastilor tratati cu substantele test. [5]

Degradarea colagenului din matricea extracelulara se datoreaza activitatii proteolitice a MMP-urilor exprimate atat de fibroblastele dermice cat si de celulele inflamatorii, cu rol important in remodelarea matriceala de la nivelul pielii supuse proceselor inflamatoare de lunga durata [6]

Pentru a investiga efectul biocomplexelor asupra metabolismului componentelor din matricea extracelulara au fost studiate doua gelatinaze: MMP-2 si MMP-9, rezultatele experimentale obtinute fiind prezentate in tabelul de mai jos:

		Colagen				MMP					
		$\mu\text{g OH-Pro}/2 \cdot 10^5 \text{ celule/ml}$ ( $\mu\text{g}/2 \cdot 10^4$ )		MMP 9 (Gelatinaza B)		MMP2 (Gelatinaza A)					
		48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
Martor celular		1.027	1.173	3.92		11.96		13.99		41.78	
Martor solvent		1.074	1.280	4.60		24.65		16.12		39.78	
Dermo U	0.5 $\mu\text{M}$	0.975	-10.15	1.947	34.3	4.26	-7.4	22.94	-6.9	22.89	29.6
	1 $\mu\text{M}$	1.210	11.24	2.642	51.6	3.44	-25.2	22.02	-10.7	19.20	16.04
Dermo Oz-8	1 $\mu\text{g/ml}$	5.36	79.9	3.54	63.8	9.03	49.1	22.66	-8.1	23.79	32.2
	5 $\mu\text{g/ml}$	4.430	75.76	3.94	67.5	9.18	49.9	24.65	-12.2	2.44	36.63
	10 $\mu\text{g/ml}$	3.75	71.36	3.11	58.8	7.25	36.6	20.17	-18.17	31.75	49.22
Dermo O	5 $\mu\text{M}$	2.81	61.779	4.39	70.8	4.39	-4.6	26.97	8.6	17.05	5.45
	10 $\mu\text{M}$	3.31	67.56	5.13	75.05	3.92	-14.8	26.11	5.59	25.21	36.05
	15 $\mu\text{M}$	3.13	65.69	5.21	75.5	3.94	-14.3	22.85	-7.3	26.40	38.9

Dermo Oz-8 si Dermo O induc, intr-o maniera dependenta de doza aplicata, atat biosinteza colagenului cat si activarea MMP2, in timp ce MMP9 la 48h este puternic activata de catre Dermo Oz-8 si usor inactivata de Dermo O. Testat in conditii similare, Dermo U dupa 72h stimuleaza acumularea de colagen biosintetizat iar dupa 48h activeaza MMP2.

**Modularea TGF $\beta$  proteina cheie in homeostazia colagenului** – s-a realizat prin citometrie in flux –tehnica de detectie a analitilor solubili prin cuplare cu beads-i de captura fluorescenti: Kiturile (Human TGF beta1 Single Plex Flex Set si Human Soluble Protein Master Buffer Kit - BD CBA).

Rezultatele, exprimate in ng/ml TGF- $\beta$ , sunt prezentate in tabelul de mai jos:

	TGF beta (ng/ml)	
	48h.	72h.
Martor celular	105,62	218,60
Martor solvent	115,72	220,90
Dermo U 0,5uM	215,13	315,20
Dermo U 1uM	87,99	235,10
Dermo U 3uM	95,70	228,70
Dermo O 5uM	194,20	262,30
Dermo O 10uM	364,33	480,30
Dermo O 15uM	98,44	201,30
Dermo Oz 1ug/ml	65,90	169,60
Dermo Oz 5ug/ml	82,70	185,40
Dermo Oz 10ug/ml	129,70	205,90
Vitamina C 10uM	208,51	305,60

La 48h. de actiune, DERO O 10 $\mu$ M si DERO-U 0.5  $\mu$ M actioneaza in sensul cresterii concentratiei de TGF-beta in mediul extracelular, ceea ce poate conduce la inhibitia activitatii metaloproteinazelor si stimularea sintezei de colagen, in sensul reconstructiei matrixului extracelular, cu efect in imbatranirea cronologica intrinseca.

Dermo Oz 1 $\mu$ M si 10  $\mu$ M inhiba secretia de TGF- $\beta$ , cu implicatii in activarea metaloproteinazelor, avand actiune antifibrotica pozitiva in procesul de vindecare tisulara si foto-imbatranire.

Dupa 72 h. de actiune, compusii DERO O 10 $\mu$ M si DERO-U 0.5  $\mu$ M isi mentin actiunea de stimulare a secretiei TGF- $\beta$ .

Dermo Oz 1 $\mu$ M isi mentine efectul de inhibare a TGF- $\beta$ , ceea ce indica activarea metaloproteinazelor si actiune de remodelare tisulara.

### c) Expresia integrinelor $\alpha 1\beta 1$ si $\alpha 2\beta 1$ cu rol de adeziune celula-matrice extracellulara

Integrinele sunt proteine functionale alcătuite din 2 subunitati glicoproteice ( $\alpha$  si  $\beta$ ) care se extind de-a lungul membranei, capabile sa lege multiplii liganzi, printre care si molecule din matrixul extracelular, avand un rol important in adeziunea celulara, miscarea si migrarea celulara. Integrina  $\alpha 1\beta 1$  mediaza feed-back-ul de reglare a sintezei de colagen, realizand legaturi de tip celula –colagen sau celula –laminina1 din matrixul extracelular, iar Integrina  $\alpha 2\beta 1$  mediaza stimularea colagenazei de tip I (MMP1) cu rol in fibrilogeneza (organizarea colagenului in fibrile), leaga colagenul de tip I. Balanta intre Integrina  $\alpha 1\beta 1$  si Integrina  $\alpha 2\beta 1$  este importanta pentru mentinerea echilibrului intre degradarea si sinteza de colagen.[7],[8],[9]. Testele s-au realizat prin tehnica de evidențiere a integrinelor prin citometrie in flux ce utilizeaza anticorpi monoclonali pentru lanturile  $\alpha$  si  $\beta$  (CD 49a) marcat

fluorescent pentru PE, corespunzator subunitatii  $\alpha$ 2; CD49b, marcat fluorescent pentru FITC, corespunzator subunitatii  $\alpha$ 1; si CD 29 marcat fluorescent pentru APC, corespunzator subunitatii  $\beta$ 1).

Rezultatele (media a 3 experimente) sunt prezentate in tabelul de mai jos sub forma medianei canalelor de fluorescenta corespunzatoare expresiei celor 3 lanturi glico-proteice:

Substanta testata	FITC-A Mean (CD 49b - Integrina alfa1)	% de variatie	PE-A Mean (CD 49a - Integrina alfa1)	% de variatie	APC-A Mean (CD 29 - Integrina beta1)	% de variatie
MARTOR	14448,00		5837,00		5310,67	
DMSO	13759,67	-4,76	6206,33	6,33	6206,33	16,83
TGF beta 4ng/ml	46264,00	220,21	7005,0	20,01	7005	31,92
Dermo U 0,5uM	21138	46,30	5005,00	-14,25	5005,00	-5,74
Dermo U 1uM	23410	62,03	5115,00	-12,37	5115,00	-3,67
Dermo U 3uM	10691	-26,00	3925,0	-32,76	3925	-26,08
Dermo O 5uM	27155	87,95	4600,00	-21,19	4600,00	-13,37
Dermo O 10uM	14364,3	-0,58	4829,67	-17,26	4829,67	-9,05
Dermo O 15uM	10827	-25,06	4744,0	-18,73	4744	-10,66
Dermo Oz 5ug/ml	30387	110,32	5255,0	-9,97	5255	-1,04
Dermo Oz 10ug/ml	37317	158,28	6153,0	5,41	6153	15,83

S-a evidențiat acțiunea extractelor Dermo-U 0,5  $\mu$ M, Dermo U 1 $\mu$ M, Dermo-O 5  $\mu$ M și Dermo-Oz 5 și 10  $\mu$ M, doar asupra inducerii supraexpresiei lantului glicoproteic  $\alpha$ 2, ceea ce indică o **amplificare a legăturilor fibroblast – colagen de tip I și stimularea activității collagenazei cu rol în fibrilogeneza**. Efectul determinat este similar cu cel al martorului pozitiv (TGF beta 4ng/ml).

#### d) expresia genelor responsabile de restructura matrixului dermic:

S-a urmat expresia de gene specifice desfasurarii unor mecanisme celulare care reflectă *efectul anti-ageing*, analizându-se următoarele gene: colagen tip I, III și elastina ce codifică principalele proteine din matricea dermala care conferă sustinere și elasticitate; metaloproteinaza-1 ca protează în principal a colagenului de tip I; TIMP-1 (tissular inhibitor MMP-1) ca inhibitor fiziological al MMP-1 și lisil-oxidaza cu rol de conversie a tropoelastinei în elastina insolubila prin desaminare oxidativă, precum și în cross-link-ul fibrelor de colagen.

**Dermo-U** manifestă acțiune anti-aging în maniera dependenta de doza, având efect semnificativ asupra sintezei colagenului cu efect concomitant asupra MMP-1 și de inhibare proporțională a acestuia prin activarea TIMP-1.

**Dermo-O 15µM** asigura un efect anti-aging prin stimularea turn-over-ului moleculelor cheie implicate in functia de sustinere a tesutului conjunctiv dermal.

**Dermo-ET** manifesta efect semnificativ asupra lisil-oxidazei – enzima cu rol in maturarea fibrelor de colagen.

Fitocompus analizat	COL-1 (colagen tip I)			COL-3 (colagen tip III)			MMP-1 (metaloproteinaza 1)			TIMP-1 (inhibitorul tisular al MMP-1)			ELN (elastina)			LOX (lisil oxidaza)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<b>Dermo-U</b>																		
0.5 µM	0.28	0.86	+1.4	0.45	0.86	+0.14	+1.02	+1.36	+0.57	+1.02	+0.99	+0.98	0.56	0.63	0.906	0.63	0.76	0.916
1 µM	0.63	+1.63	+1.44	0.547	+1.80	+0.82	0.31	+1.69	+1.35	+1.12	+1.34	+0.05	0.486	0.563	0.96	0.72	0.63	0.927
3 µM	+1.38	+1.23	0.63	+1.42	+1.11	0.72	+1.08	+0.99	+0.07	+1.54	+1.07	0.76	0.258	0.152	0.011	0.135	0.19	0.07
<b>Dermo-O</b>																		
5 µM	0.375	0.75	0.66	0.28	0.69	0.55	0.244	+1.61	+1.1	0.67	+0.59	+0.05	0.136	0.196	0.268	0.305	0.432	0.501
10 µM	0.361	0.14	0.91	0.335	0.157	0.73	0.197	+0.15	0.79	+0.97	+0.57	+0.18	0.263	0.365	0.556	0.415	0.516	0.641
15 µM	0.425	0.65	+3.67	0.403	+0.99	+2.21	0.317	+0.95	+1.96	+0.90	+0.80	+0.06	0.189	0.426	0.558	0.326	0.481	0.589
<b>Dermo-ET</b>	0.418	0.055	0.488	0.308	0.134	0.976	+1.014	+1.0	0.993	+0.12	0.377	0.999	0.427	+0.06	+0.75	0.356	+1.17	+0.05
1/500																		
1/1000	0.632	0.818	0.743	0.545	+0.09	0.899	+0.5	+1.77	+0.07	+0.5	0.984	1.056	0.813	+1.05	+1.13	0.622	+2.34	+1.0

"+" indica faptul ca fitocompusul are efect de upreglare a expresiei genei respective raportat la mărtorul netratat

## II. Demonstrarea efectului estrogen mimetic al extractului de Trifolium pratense

Efectul s-a evidențiat pe culturi de fibroblasti dermici umani (linie celulară selectivă pentru efectul urmarit), prin date complementare la nivelul ratei de multiplicare celulară și a stimulării sintezei de colagen și a modularii activității metaloproteinazelor.

**Extractul de trifoi, Dermo ET izolat din Herba Trifolium pratense**, conține ca principii active daidzeina, genisteina, formononetina și biochanina A, astfel că în demonstrarea acțiunii sale s-a evaluat comparativ și activitatea acestor componente, precum și a combinației lor în dozele corespunzătoare extractului de trifoi.

**S-au realizat 2 serii de testare**, una cu conținut normal de estrogeni în mediul de cultură, cealaltă cultivată în condiții de depletie estrogenică (ser fetal fără estrogeni). S-a analizat statusul proliferativ celular prin tehnici complementare de analiză: secevențialitatea ciclului celular și succesiunea generațiilor proliferative (citometrie în flux, marcare cu iodura de propidiu și respectiv CFSE - carboxy fluorescein diacetat succin imidil ester), corelate și cu determinarea influenței asupra sintezei de colagen și a activității metaloproteinazelor.

Rezultatele s-au estimat ca Indice de Proliferare, respectiv suma procentelor de celule în fazele de multiplicare S și G2/M, calculate cu un soft de analiză specific (FACS Express V3 modulul DNA cell cycle și proliferare). Tabelele de mai jos prezintă acțiunea compusilor

asupra liniilor celulare standardizate de fibroblasti umani normali (HS 27), comparativ cu martorul pozitiv (beta estradiolul 1nM):

	mediu cu continut normal de estrogeni			mediu fara estrogeni				
	%faza S+G2/M	% de variatie	Indice proliferare	% de variatie	%faza S+G2/M	% de variatie	Indice proliferare	% de variatie
MARTOR	23,5		3,5		18,5		2,4	
Martor solvent	27,7		3,0		19,5		2,6	
Dermo ET 1/1000	28,9	23,0	4,2	19,4	25,7	39,1	4,3	79,2
Dermo ET 1/2000	25,3	7,8	4,2	18,6	25,1	35,6	3,9	62,5
Formononetin echivalent Dermo ET1/2000	49,7	111,5	2,8	-19,4	44,2	138,9	3,5	45,0
Formononetin echivalent Dermo ET 1/1000	48,4	106,0	3,2	-8,0	47,6	137,3	6,0	149,2
Biochanina echivalent Dermo ET 1/2000	51,3	118,3	2,4	-32,0	48,7	163,3	3,8	56,3
Biochanina echivalent Dermo ET 1/1000	47,2	100,9	3,9	10,6	47,3	155,7	6,0	150,8
Genisteina echivalent Dermo ET 1/2000	29,4	25,1	3,8	9,1	30,0	62,2	4,0	67,9
Genisteina echivalent Dermo ET 1/1000	17,4	-25,9	3,3	-5,4	23,1	25,0	3,8	58,3
Daidzeina echivalent Dermo ET 1/2000	46,1	96,2	2,6	-24,6	51,6	178,9	4,1	71,7
Daidzeina echivalent Dermo ET 1/1000	27,8	18,3	3,5	-0,6	44,5	140,5	4,1	71,7
(Daidzeina+Genisteina+Biochanina+Formononetin) echivalent Dermo ET 1/1000	56,1	138,7	5,4	53,4	50,6	173,5	3,5	45,8
(Daidzeina+Genisteina+Biochanina+Formononetin) echivalent Dermo ET 1/2000	54,0	129,8	5,1	45,1	48,8	163,8	3,6	49,6
17 beta estradiol 1nM	53,6	128,1	3,48	-0,6	54,6	195,1	4,11	71,3

Fitoprodusul Dermo-ET stimuleaza rata de proliferare celulara a fibroblastilor atat in conditii normale de dezvoltare celulara, cat si in conditii de depletie estrogenica, similar cu estrogenul sintetic,  $\beta$ -estradiolul. Efectul estrogen- mimetic este demonstrat de fiecare component al amestecului de izoflavone, in special de daidzeina, formononetin si biochanina in ceea ce priveste rata de sinteza ADN si initierea mitozei in cadrul ciclului de diviziune celulara

In tabelul de mai jos este prezentat efectul Dermo-ET asupra statusului colagenului din matricea extracelulara a culturii de fibroblast normal linia HS27

Substantă	Colagen µg OH-Pro/ $2 \times 10^3$ celule/ml				MMP							
	Cu estradiol		Fara estradiol		MMP9				MMP2			
		%		%		%		%		%		%
Martor	0,0712		0,0586		90,84		88,13		94,26		94,86	
Martor solvent	0,0617		0,0567		89,11		73,85		93,3		93,2	
17 beta estradiol lnM	0,0512	-39,1	0,1153	42,7	90,49	1,5	30,05	-146	93,77	0,5	68,73	-36
Daidzeina echivalent Dermo ET 1/1000	0,0758	18,6	0,0651	12,9	74,08	-20	70,7	-4,5	90,61	-3,0	94,26	1,1
Daidzeina echivalent Dermo ET 1/2000	0,0761	18,9	0,0673	15,3	73,83	-21	76,05	2,9	89,69	-4,0	96,06	3,0
Genisteina echivalent Dermo ET 1/1000	0,0325	-89,8	0,0659	14,0	76,21	-17	74,06	0,3	91,95	-1,5	93,34	0,1
Genisteina echivalent Dermo ET 1/2000	0,0287	-114,9	0,0620	8,5	79,08	-13	68,87	-7,2	92,98	-0,3	95,28	2,2
Biochanina echivalent Dermo ET 1/1000	0,0370	-66,7	0,0321	-76,6	81,52	-9,3	76,69	3,7	91,63	-1,8	92,86	-0,4
Biochanina echivalent Dermo ET 1/2000	0,0436	-41,5	0,0104	-445	72,71	-23	71,05	-3,9	89,96	-3,7	90,48	-3,0
Formononetin echivalent Dermo ET 1/1000	0,0583	-5,83	0,0310	-83	71,96	-24	70,81	-4,3	95,95	2,8	93,2	0,0
Formononetin echivalent Dermo ET 1/2000	0,0396	-55,8	0,0231	-146	77,11	-16	63,99	-15,4	94,32	1,1	82,74	-12,6
Dermo ET 1/1000	0,1012	39,03	0,0881	35,6	73,18	-23	69,23	-6,7	94,61	1,4	93,74	0,6
Dermo ET 1/2000	0,0774	20,28	0,0716	20,8	78,55	-13	64,11	-15,2	94,32	1,1	90,56	-2,9
Daidzeina+Genisteina+Biochanina+Formononetin) echivalent Dermo ET 1/1000	0,0736	21,50	0,0897	36,8	92,95	4,1	27,15	-172	96,71	3,5	56,36	-65
(Daidzeina+Genisteina+Biochanina+Formononetin) echivalent Dermo ET 1/2000	0,0455	-35,60	0,0690	17,8	91,04	2,1	28,36	-161	95,86	2,7	62,41	-49

Daidzeina induce la nivelul fibroblastilor mentinuti in conditii normale de crestere atat biosinteza colagenului de tip I si III, cat si inactivarea enzimei proteolitice MMP9, ajutand astfel la cresterea cantitatii de proteine structurale pentru reconstructia matrixului extracelular. Cei alți fitohormoni analizați individual (genisteina, biochanina și formononetinul) inhibă enzimele proteolitice matriceale, dar nu intervin în procesul de biosinteza a colagenului. În schimb, asocierea acestor fitohormoni în diferite combinații potențează cu cel puțin 13.5% efectele Daidzeinei, aspect observat și în cazul extractului de *Trifolium pratense*, Dermo ET.

De asemenea, Dermo ET reechilibrează homeostasia colagenului în condiții de depletie estrogenică, aducându-l la valori apropiate de cele obținute în condiții normale de creștere, acționând în special asupra caii metabolice de biosinteza și mai puțin asupra enzimelor degradative. Daidzeina și Genisteina, într-o manieră dependenta de doza aplicată, induc biosinteza colagenului însă nu manifestă nici un efect asupra enzimelor proteolitice în medii lipsite de estrogeni.

### III. Efectul de regenerare si hidratare epidermala al preparatelor Dermo-U, Dermo-Oz si Dermo-O

Efectul s-a evidențiat pe culturi de keratinocite imortalizate (linie celulară selectivă pentru efectul urmarit), prin date privind urmatoarele mecanisme: a) modularea proliferării celulare și diferențierea evidențiată prin markeri specifici; b) expresia genică a moleculor implicate în hidratarea epidermala

#### a) modularea proliferării celulare și diferențierea evidențiată prin markeri specifici

Regenerarea epidermului reprezintă un element cheie al homeostaziei pielii și este reflectată de echilibrul dintre rata de proliferare a celulelor bazale (keratinocite nediferențiate) și rata de diferențiere a acestora, totalizând turn-over-ul celulelor epidermale. **Dermo-U 5µM, Dermo-Oz 10µg/ml și Dermo-O 5µM** induc sinteza ADN la nivel de keratinocite basale și concomitent promovează expresia markerilor de diferențiere celulară, având astfel acțiune moderată de regenerare a straturilor superioare ale pielii.

Regenerare epidermala																
Fitocomplex analizat	Proliferare celulară								Diferențiere celulară (geometric mean)							
	Ciclul celular %			Apoptoză %					Citokeratina 5/14			Transglutaminaza-1				
	G1	S	G2	Celule vii	Apoptoză timpurie	Apoptoză tarzie	Necroza		6.7mg Ca <sup>2+</sup>	8mg Ca <sup>2+</sup>	11.2mg Ca <sup>2+</sup>	6.7mg Ca <sup>2+</sup>	8mg Ca <sup>2+</sup>	11.2mg Ca <sup>2+</sup>		
Martor celular	65.33	31.40	3.23	95.85	1.65	0.78	1.72	245.63	260.37	255.2	595.59	600.43	1100.98	1815.4	2467.4	2636.3
Martor solvent	71.58	22.3	6.14	91.79	5.01	1.59	1.61	225.16	284.7	254.03	1159.3	695.22	924.35	2933.13	2114.08	2506.82
Dermo-U																
1µM	68.30	24.08	7.12	95.11	2.91	0.86	1.12	273.03	249.6	267.6	578.06	635.54	866.5	1927.62	3712.29	2338.06
3µM	69.33	22.4	7.58	93.49	3.16	1.38	1.97	214.95	253.39	337.06	625.31	548.2	563.26	2497.29	3192.34	1944.62
5µM	67.98	26.01	6.31	92.12	4.49	1.09	2.31	336.98	273.26	242.22	212.16	302.25	1892.58	2309.3	2653.9	3006
Dermo-O																
5µM	72.7	21.3	6.8	91.54	2.92	2.63	2.91	285.1	236.22	268.84	500.79	575.77	1837.91	1591.58	2308.85	2305.95
10 µM	76.3	18.66	4.54	92.90	4.80	0.95	1.34	260.89	259.76	236.51	598.44	381.73	891.3	3137.05	2858.9	1845
15 µM	77.2	19.1	3.7	92	3.78	1.96	2.26	251	254	231	620	682	756	1678	1950.3	1852.6
Dermo-Oz																
5 µg/ml	62.71	37.20	0.1	96.33	1.18	0.36	2.08	236.03	240.01	233.64	587.45	471.29	56.95	2052.02	1762.9	2761.48
10 µg/ml	62.74	37.10	0.16	96.19	1.42	0.37	2.01	261.29	256.64	414.8	1080.58	727.03	818.75	3329.47	2221.51	2315.43

**b) expresia genica a moleculor implicate in hidratarea epidermala**

Au fost analizate urmatoarele gene ce codifica molecule cu rol cheie in acest procesul de hidratare epidermala: **filagrina** – gena ce codifica profilagrina in straturile superioare ale epidermei (stratul granulos) si intra in compozitia granulelor de keratohialina. Filagrina la jonctiunea strat granulos- strat cornos este degradata de **caspaza-14** cu formarea factorilor de hidratare. **Caspaza-14** – gena analizata ce codifica molecula cu acelasi nume si care se exprima la nivelul stratului granulos al epidermei. **UGCG (glucozilsintetaza)** – gena ce codifica enzima cu rol in sinteza glucozilceramidelor in corpuri lamelari ai keratinocitelor diferențiate si care ulterior sunt eliberate extracelular cu rol de blocare a pierderii de apa din piele. **Dermo-U, Dermo-O, Dermo-L** s-au testat in conditii de stimulare a diferențierii keratinocitelor (celule epidermale) cu  $\text{CaCl}_2$  si fara stimulare a diferențierii celulare. Keratinocitele diferențiate corespund statusului fiziologic celular de la nivelul straturilor superioare ale epidermului, in principal stratului granulos. Rezultatele (tabel) ne-au indicat:

**Dermo-U** are rol important in activarea genica a principalelor molecule responsabile de hidratarea epidermala.

**Dermo-O** 5 $\mu\text{M}$  si 10 $\mu\text{M}$  determina cresterea proportionala a expresiei genelor, efectul intensificandu-se la 48h si manifestand o reducere moderata la 72h, mentinandu-se efectul fitocompusului asupra celor trei gene de hidratare.

**Dermo-L** induce expresia genelor pentru hidratare epidermala, manifestand un efect sustinut si la 72h.

Fito-compus analizat	Rezultate expresie genica, % vs control												
	24h actiune substanta				48h actiune substanta					72h actiune substanta			
	celule nediferentiate		celule diferențiate		celule nediferentiate			celule diferențiate		celule nediferentiate		celule diferențiate	
	FLG (filagrina)	UGCG (glucozil sintetaza)	FLG (filagrina)	UGCG (glucozil sintetaza)	FLG (filagrina)	UGCG (glucozil sintetaza)	CASP14 (caspaza 14)	FLG (filagrina)	UGCG (glucozil sintetaza)	CASP14 (caspaza 14)	FLG (filagrina)	UGCG (glucozil sintetaza)	CASP14 (caspaza 14)
<b>Dermo-U</b>	+4.1	+1.7	+0.5	+0.5	0.442	0.755	0.37	+2.8	+1.9	+1.6	+0.5	0.875	0.089
	5 $\mu\text{M}$	0.54	0.826	+1.3	+1.6	+1.06	+1.538	+0.28	+11	+0.2	+2.5	0.763	0.088
<b>Dermo-O</b>	+3.0	+4.2	+0.74	+0.6	0.172	0.251	0.175	+9.0	+2.9	+0.5	0.903	0.717	0.012
	5 $\mu\text{M}$										+0.515	0.875	0.023
<b>Dermo-O<sub>2</sub></b>	10 $\mu\text{M}$	+1.7	+1.5	0.34	0.78	0.2	0.735	0.263	0.6	+0.4	+0.448	+0.754	0.217
	5 $\mu\text{g/ml}$	0.621	0.75	+0.06	+0.21	+0.23	0.35	+0.06	+0.592	0.315	0.028	+1.9	0.353
<b>Dermo-ET5</b>	10 $\mu\text{g/ml}$	0.759	0.85	+0.3	+0.06	+0.09	0.69	0.985	+1.046	0.529	0.018	+0.837	+0.22
	1/500	0.853	-0.02	0.988	+0.4	+0.15	0.836	0.85	+0.35	0.756	0.677	+1.49	-0.7
<b>Dermo-ET5</b>	1/1000	0.653	0.752	0.852	+0.06	0.419	0.623	0.365	0.652	0.647	0.525	+0.31	-0.16
	1/3000	0.991	+3.3	0.375	0.721	+1.2	+0.5	+0.9	0.497	0.332	0.186	+0.266	+0.347
<b>Dermo-L</b>	1/4000	+0.061	+0.127	+1.689	+0.604	+1.061	+0.193	0.852	+1.9	+2.44	+1.81	+0.182	+0.581
													+0.602

94

"+" indica faptul ca fitocompusul are efect de upreglare a expresiei genei respective raportat la martorul netrat

#### IV. Efectul fotoprotector indus de Dermo-ET, Dermo-3FP, Dermo-L

S-a demonstrat actiunea preparatelor **Dermo-ET, Dermo-3FP si Dermo-L** in patogeneza fotoimbatranirii printr-un screening al urmatorilor parametri cellulari:

- **Inducerea apoptozei** declansata de modificari la nivel de ADN
- **Stress oxidativ celular** – activarea intracelulara a speciilor de oxigen reactive, gradul de peroxidare lipidica si interventia sistemelor antioxidante *endogene* - superoxid dismutaza, catalaza.
- **Status inflamator:** secretia citokinelor pro-inflamatorii (IL6, IL8), a IL1- $\alpha$  ca indicator de sensibilizare si iritabilitate;
- **Secretia factorului VEGF** (vascular endothelial growth factor) – promotor de angiogeneză – etapa cheie in refacerea tesutului cutanat degradat si vindecarea ranilor.

Centralizarea efectelor cumulative fotoprotectoare ale compusilor testati este prezentata in tabelele de mai jos (comparativ cu martorul pozitiv N acetil cisteina 10mM):

Composu testat	CAT (nmol/min/ml)			SOD (U/ml)			Peroxidare lipidica (nmol MDA/ml)		
	Fara iradiere	UVA iradiere	UVB iradiere	Fara iradiere	UVA iradiere	UVB iradiere	Fara iradiere	UVA iradiere	UVB iradiere
Martor cellular	1.6434	0.2494	0.0165	2776.8	595	1.30	0.036	0.1163	0.0877
Control solvent (PG)	0.7162	0.2381	0.0154	1595	500	2.17	0.105	0.1140	0.0903
Dermo ET	0.75ml	0.3988	0.2670	0.0209	2951	675	1.25	0.0389	0.0996
	1.5ml	1.8216	0.3921	0.0324	3495	875	4.32	0.01122	0.0817
Dermo L	0.375	0.08593	0.3665	0.0282	2261	618	1.96	0.0843	0.0894
	0.75	0.2898	0.2399	0.0245	1734	520	2.05	0.0832	0.093

Substanță testată / Efect biologic	Iradiere UV-A									
	Protectie fata de apoptoza				Inhibiție IL1α (pg/ml)	Inhibiție VEGF (pg/ml)	Inhibiție Citokine pro-inflamatorii		Inhibiție Stress oxidativ	
	% celule vii	% celule apoptotice timpurii	% celule apoptotice tarzii	% celule necrotice			IL6(pg/ml)	IL8(pg/ml)	Mediana canala lui de fluorescenza FITC-A ( $H_2O_2$ )	Mediana canala lui de fluorescenta PE-A ( $O_2^-$ )
Martor celular	58.1	37.7	4.0	0.2	358,26	358,26	275,36	607,99	33502	28223
Martor de solvent	56	39	4.5	0.4	392,72	392,72	279,37	564,68	30546	26871
Dermo-ET 1/500	61.7	32.5	5.2	0.6	389,58	389,58	123,91	263,95	19609	15218
Dermo-ET 1/1000	59.4	40.9	8.1	0.5	371,92	371,92	143,76	521,73	28311	18723
Dermo-L 1/2000	39.7	28.4	35.4	6.4	445,12	141,93	108.7	327.8	28976	22859
Dermo-L 1/4000	29.0	32.0	36.8	8.2	368,34	168,14	102.3	302.5	27719	22839
Dermo-3FP 1/2000	67.9	27.3	4.5	0.4	349,15	273,89	263.9	605.3	28012	19887
Dermo-3FP 1/3000	71.7	23.9	4.2	0.3	354,81	373,53	283.5	593.1	28564	19774
N-Acetyl Cysteina	65,1	10,3	8,3	6,3	289,85	320,65	105,8	120,3	17896	16254

Substanță testată / Efect biologic	Iradiere UV-B									
	Protectie fata de apoptoza				Inhibiție IL1α (pg/ml)	Inhibiție VEGF (pg/ml)	Inhibiție Citokine pro-inflamatorii		Inhibiție Stress oxidativ	
	% celule vii	% celule apoptotice timpurii	% celule apoptotice tarzii	% celule necrotice			IL8(pg/ml)	IL6(pg/ml)	Mediana canala lui de fluorescenza FITC-A ( $H_2O_2$ )	Mediana canala lui de fluorescenza PE-A ( $O_2^-$ )
Martor cellular	61.8	33	4.8	0.3	328,71	526,5	835,8	2105,68	31272	21415
Martor de solvent	56.9	40.2	2.4	0.5	349,97	511,0	991,22	2274,85	23052	20544
Dermo-ET 1/500	64.6	30.9	4.1	0.3	202,69	529,57	833,11	1725,04	18078	18323
Dermo-ET 1/1000	64.1	32.1	3.4	0.2	237,61	498,67	870,99	2241,54	17973	23417
Dermo-L 1/2000	60.3	16.8	16.1	6.9	227,54	317,16	653,3	2043,6	21633	19366
Dermo-L 1/4000	66.5	15.1	12.6	5.7	259,66	336,83	608,3	1987,5	21184	19735
Dermo-3FP 1/2000	74.3	21.7	3.9	0.1	309,25	410,02	806,5	2089,4	12014	18557
Dermo-3FP 1/3000	74.2	21.8	3.9	0.1	339,18	276,17	812,3	2137,5	10115	17336
N-Acetyl Cysteina	71,1	23,3	5,3	0,2	289,85	320	458	1208	18774	15443

Se constata un efect diferențiat al compusilor, fiecare actionand asupra altor cai de propagare a degradarii celulare si inflamatiei induse de iradierea UV:

**Extractul de trifoi, Dermo-ET** are efect de protectie celulara fata de apoptoza indusa de radiatia UV, de stopare a procesului inflamator delcansat prin semnalizarea citokinelor IL6 si IL8, antioxidant puternic, actionand la nivel enzimatic, cu consecinte asupra reducerii intracelulare a speciilor de oxigen reactive, in special in conditiile iradierii UV-A.

Fitocompusul **Dermo-L** obtinut din lucerna previne apoptoza celulara, stopeaza progresia inflamatiei (efect antiiritativ – anti IL1α; antiinflamator- anti IL6 si IL8)- in cazul arsurilor solare (iradiere UV-B), inhiba factorul VEGF de progresie a angiogenezei in ambele

situatii de iradiere UV, actioneaza la nivelul enzimelor implicate in protectia oxidativa, cu consecinte asupra reducerii intracelulare a speciilor de oxigen reactive.

**Extractul de trei frati patati, Dermo-3FP** are efect de protectie celulara fata de apoptoza indusa de radiatia UV-A si UV-B, are activitate antioxidantă prin scaderea nivelului intracelular al speciilor de oxigen reactive si reduce angiogeneza in ambele situatii de iradiere UV

Complementaritatea acestor efecte recomanda asocierea lor in produse dermatocosmetice de protejare a zonelor expuse.

#### V. Efectul antioxidant si fotoprotector indus de Dermo-U, Dermo-O, Dermo-Oz

Pentru evidențierea actiunii antioxidantă a fitocompusilor s-au efectuat teste pe linii celulare de keratinocite în condiții de stimulare cu PMA (acetat de forbol miristat)  $1\mu M$  timp de 24h, ca stimul oxidativ endogen sub acțiunea concomitenta a substantelor active de testat. PMA are rol de activare a NAPDH oxidazei, enzima cu rol în cataliza formării radicalilor liberi de oxigen (anionul superoxid care poate fi redus ulterior la peroxid de hidrogen). Radicalii liberi de oxigen aflati in exces induc numeroase injurii la nivelul acizilor nucleici, proteinelor si lipidelor generand anomalii genetice, precum si derivati lipidici si proteici oxidati cu efecte daunatoare asupra celulei. Evaluarea efectului antioxidant s-a efectuat prin flow-citometrie, prin analiza emisiei fluorescentei dupa marcarea specifica a anionului superoxid si peroxidului de hidrogen atat in conditii de nestimulare cat si de stimulare cu PMA.

*Dermo-U* determina reducerea speciilor reactive de oxigen ( $O_2^-$  si  $H_2O_2$ ) la concentratia de  $7\mu M$  in conditii de simulare a stresului oxidativ endogen. *Dermo-O*  $15\mu M$  scade semnificativ nivelul peroxidului de hidrogen la stimularea PMA. *Dermo-Oz*  $5$  si  $10\mu g/ml$  prezinta efect antioxidant remarcabil, actionand prin anihilarea ambelor specii reactive de oxigen la producerea intrinseca in exces a acestora. Efectul antioxidant manifestat prin reducerea peroxidului de hidrogen/anion superoxid denota un mecanism de actiune orientat fie catre anihilarea directa a anionului  $O_2^-$ , sintetizat sub acțiunea NADPH oxidazei fie catre activarea sistemului enzimatic antioxidant (superoxid dismutaza/catalaza).

Fitocompus analizat	Celule nesterilate cu PMA		Celule stimulate cu PMA 1µM timp de 24h	
	Anion superoxid (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	Peroxid de hidrogen (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Anion superoxid (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	Peroxid de hidrogen (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
	media geometrica			
Martor celular	4138	9079	12268	17104
Martor solvent (DMSO)	3430	2459	15507	16420
Dermo-U 3µM	3720	2403	17456	21411
Dermo-U 5µM	3999	4170	15114	10557
Dermo-U 7µM	3720	2403	11053	7099
Dermo-O 5µM	4368	3508	13920	9903
Dermo-O 10µM	4502	4983	14642	10996
Dermo-O 15µM	4841	5269	14912	9179
Dermo-Oz 5µg/ml	4949	13598	4724	1842
Dermo-Oz 10µg/ml	4794	10834	5349	8539
Vitamina C 30µM	4977	14473	3801	7013

**Actiunea fotoprotectoare** a fitocompusilor a fost determinata prin analiza flow-citometrica a speciilor reactive de oxigen (O<sub>2</sub><sup>-</sup> si H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) la scurt timp (4h) dupa iradierea cu UVA (8 J/cm<sup>2</sup>) si UVB (0.02 J/cm<sup>2</sup>) si la un interval de timp mai lung (24h) dupa iradiere cand s-au evideniat si efectele induse de nivelul crescut al ROS asupra mecanismelor de declansare a apoptozei si trecerii celulelor in diferite faze care stagneaza sau accelereaza ciclul celular. Keratinocitele (linia celulara HaCaT) au fost tratate cu fitocompusi timp de 24h inainte de expunerea acestora la radiatiile UV.

Proprietatile fotoprotectoare pentru o substanta sunt definite fie de rolul de filtru UV fie de efectul acesteia de anihilare imediata a efectelor nocive induse de radiatii. Fitocompusii studiati au capacitatea de restrictionare imediata (4h dupa iradiere) a producerii speciilor reactive de oxigen (ROS) comparativ cu martorul netratat. *Dermo-U* asigura o bariera de protectie antiradicalara imediat dupa expunerea UV, in conditiile in care martorul netratat prezinta un nivel semnificativ ridicat al ROS. De asemenea, *Dermo-U* prezinta un efect remarcabil de frenare a proliferarii aberante a celulelor, declansata de expunerea in special la UVB, nefiind observate efecte de impulsare semnificativa a celulelor in etape avansate ale apoptozei. Astfel ca fitocompusul *Dermo-U* are rol de preventie imediata a proceselor oxidative induse de radiatiile UVA si UVB. *Dermo-O* manifesta actiune similara cu Dermo-U in privinta protectiei imediate la expunera UVA si UVB, si numai doza de 15µM prezinta si actiune de contracarare a factorilor declansatori ai proceselor proliferative aberante dupa iradiere UVB. *Dermo-Oz* are acelasi rol de protectie imediat dupa iradiere ca si Dermo-O si Dermo-U, evidentiuindu-se insa un efect antioxidant sustinut si la 24h. Pentru *Dermo-Oz*

5 $\mu$ g/ml si 10 $\mu$ g/ml, functia fotoprotectoare este demonstrata si de efectul de limitare a avansarii fazelor apoptotice, fiind redus semnificativ procentul de celule in necroza vs. martor ne tratat.

Fitocompens asimilat	celule neiradiate (martor la 4h dupa iradiere)		4h dupa iradiere				celule neiradiate (martor la 24h dupa iradiere)		24h dupa iradiere																	
	stres oxidativ		stres oxidativ (medie geometrica)				stres oxidativ		stres oxidativ				ciclu celular			apoptoză										
	$H_2O_2$	$O_2$	UVA 8 J/cm <sup>2</sup>		UVB 0.02 J/cm <sup>2</sup>		$H_2O_2$	$O_2$	UVA 8 J/cm <sup>2</sup>		UVB 0.02 J/cm <sup>2</sup>		UVA 8 J/cm <sup>2</sup>			UVB 0.02 J/cm <sup>2</sup>			UVA 8 J/cm <sup>2</sup>							
			$H_2O_2$	$O_2$	$H_2O_2$	$O_2$			$H_2O_2$	$O_2$	$H_2O_2$	$O_2$	G1 %	S%	G2%	G1 %	S%	G2%	Celule vii %	Apoptoză timpurie %	Apoptoză tarzie %	Necroza %	Celule vii %	Apoptoză timpurie %	Apoptoză tarzie %	Necroza %
Martor cellular	4138	9079	11089	9586	7526	7588	214	4140	372	4007	331	5236	30	46	23	14	85	1.0	86.46	3.44	6.28	3.82	77.95	7.91	5.71	8.44
Martor solvent (DMSO)	3430	2459	17917	11719	9719	8965	231	4056	291	4195	347	5495	35	44	22	21	78	1.0	83.5	7.13	7.57	1.80	71.71	9.10	3.97	9.30
Dermo-U 3 $\mu$ M	3720	3403	2932.4	5149	3212	5216	213	3983	306	4091	353	5532	34	46	20	59	40	1.0	78.4	8.69	9.67	3.28	73.77	6.52	7.91	11.78
Dermo-U 5 $\mu$ M	3999	4170	5115.9	6365	6257	6559	216	4216	325	4182	377	10388	34	46	20	52	39	9.0	79.6	7.37	10.39	1.62	74.74	4.45	12.92	7.88
Dermo-U 7 $\mu$ M	3720	1403	3581	5995	1700	4408	216	4172	348	4875	398	10207	36	48	16	19	30	1.0	73.31	9.47	15.54	1.57	64.71	6.07	30.89	8.33
Dermo-O 0.5 $\mu$ M	4388	3508	4599	5566	5174	6554	195	3861	196	4181	406	10230	35	48	17	25	74	1.0	76.15	8.08	12.43	3.24	81.16	2.66	5.98	10.20
Dermo-O 10 $\mu$ M	4502	4982	9114	8277	6090	7404	196	3985	189	4951	449	11247	35	46	19	17	82	1.0	73.0	7.14	15.05	4.81	79.82	2.11	7.00	11.06
Dermo-O 15 $\mu$ M	4841	5289	10995	9239	9358	8917	208	3667	356	4008	404	10208	36	43	21	65	34	1.0	58.15	2.68	30.92	18.23	53.30	3.44	14.30	28.97
Dermo-Oz 5 $\mu$ g/ml	4949	12698	11504	9139	6763	7549	220	4023	241	3899	418	10489	31	47	22	18	31	1.0	77.46	6.30	14.69	1.55	78.48	3.97	6.17	11.39
Dermo-Oz 10 $\mu$ g/ml	4794	10334	5209	6353	3179	7599	217	4605	322	3915	388	10845	37	60	3	28	71	1.0	76.15	9.05	13.57	2.26	82.77	2.62	4.95	9.66
Vitamina C 10 $\mu$ M (martor pozitiv)	4971	14473	16289	11415	9400	9781	250	4380	501	5970	366	9342	37	45	18	18	80	1.0	86.36	3.61	7.91	1.13	64.81	4.45	19.89	11.05

Conform asocierii de componente bioactive propuse se obtin 8 tipuri de produse dermatocosmetice cu efect de preventie si combatere a imbatranirii cutanate prin mecanisme celulare convergente, precum si de regenerare a structurilor dermo-epidermice afectate de agresiuni ale mediului exterior, rani usoare, afectiuni dermatologice de tip acneic :

- Crema de zi de tip antiageing, destinata persoanelor sub 45 ani
- Crema antiageing de zi pentru grupa de varsta peste 45ani
- Crema antiageing de noapte pentru grupa de varsta sub 45 ani
- Gel / lotiune after-shave, adjuvant in terapia antiageing
- Crema de maini cu efect reparator
- Crema de remodelare cutanata post-traumatica
- Lotiune pentru protectie solara

- Crema antiacneica de zi cu efect de remodelare cictriala

**Avantajele invenției** în raport cu stadiul tehnicii sunt următoarele:

- Sunt asociate efecte biologice la nivel de celula tinta ce acopera intreaga diversitate de procese specifice procesului de imbatranire si de regenerare a structurilor dermo-epidermice:
  - estrogen mimetic si dermo-restitutiv (**compusul Dermo-ET** din *Trifolium pratense*),
  - stimularea ratei de proliferare celulara, a sintezei de colagen si a expresiei integrinelor responsabile de fermitatea tesutului cutanat (**compusul Dermo-U** din *Salvia officinalis*, **Dermo-O** din *Calendula officinalis*),
  - regenerare epidermala si preventia depozitelor fibrilare imperfecte (**Dermo-Oz** din *Calendula officinalis*),
  - hidratare (**compusul Dermo-U** din *Salvia officinalis*, **Dermo-O** din *Calendula officinalis* si **Dermo-L** din *Medicago sativa*), antioxidant, antiinflamator si fotoprotector prin mecanisme complementare de preventie a efectelor radiatiei UV (**compusul Dermo-U** din *Salvia officinalis*, **Dermo-O** si **Dermo-Oz** din *Calendula officinalis*, **Dermo-L** din *Medicago sativa* si **Dermo-3FP** din *Viola tricolor*).
- Actiunile asociate sunt demonstate prin tehnici specifice la nivel celular si genetic ce confera precizia efectului declarat

În continuare sunt descrise exemple de realizare a invenției, care se referă la produsele dermato- cosmetice dezvoltate pe baza asocierii actiunilor de tip antiageing si de refacere a structurilor dermo-epidermice afectate.

**Exemplul de realizare nr. 1 : Produs dermatocosmetic**, conținand ca substanțe biologice active produsul fitoterapic **Dermo-U 0.01÷0.5%**, **Dermo-L 1.00÷5.00** si produsul fitoterapic **Dermo-3FP 0.50÷1.50%**, condiționat sub formă de crema, utilizabil în **terapia antiageing**.

**Formula de conditionare (crema antiageing de zi destinata grupei de varsta pana in 45 ani):**

Nr.crt	Denumire INCI materie prima	Cant.%
1	Aqua	Ad.100
2	Phenoxyethanol (and) Potassium sorbat	0.60÷1.00
3	Glycereth-26	1.00÷5.00
4	Acrylates / C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	0.10÷0.50
5	Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate	1.25÷5.00
6	Cetearyl Alcohol	1.50÷4.50
7	Vitis Vinifera Seed Oil	1.00÷8.00
8	Simmondsia Chinensis Seed Oil	1.00÷5.00
9	Hydrogenated olive oil	1.00÷5.00
10	Cetyl Alcohol	1.00÷3.00
11	PEG-100 Stearate	0.10÷2.00
12	Glicerine	1.00÷5.00
13	Bisabolol	0.05÷0.20
14	Sodium hydroxid solution	0.13÷0.50
15	Phlakenetia Vohobilis Seed Oil	1.00÷5.00
16	Parfum	0.01÷0.30
17	Poliquaternium-39	0.15÷1.00
18	Caprylic/Capric Triglyceride	3.00÷8.00
19	Squalane	2.00÷6.00
20	Butylated hydroxyanisole	0.02÷0.20
21	Disodium EDTA	0.05÷0.20
22	Salvia officinalis extract - Dermo-U	0.01÷0.50
23	Viola tricolor extract - Dermo-3FP	0.50÷1.50
24	Medicago sativa extract - Dermo-L	1.00÷5.00
25	Triticum aestivum extract	1.00÷3.00

Datorita asocierii fitocompusilor biologic activi cu efecte complementare si cumulative, produsul dermatocosmetic prezinta actiune dermo-restitutiva prin activitatea **Dermo-U** (stimularea ratei de proliferare celulara, a sintezei de colagen si a expresiei integrinelor responsabile de fermitatea tesutului cutanat), **Dermo-L** (protectie celulara fata de radiatia UV si fermitate la nivel dermic prin supraexpresia integrinelor) si **Dermo-3FP** (anti-inflamatoare, antioxidantă si fotoprotectoare, inclusiv de inhibitie a angiogenezei declansate de radiatia UV). Pe langa aceste doua principii active, produsul mai contine si extractul de tarate de grau cu efect de hidratare si regenerare epidermala, cumularea tuturor acestor actiuni la nivel de celula tinta recomandandu-l cu precadere pentru **terapia de preventie si combatere a primelor semne ale imbatranirii, sub forma de crema de zi.**

**Exemplul de realizare nr. 2: Produs dermatocosmetic, continand ca substanțe biologic active produsul fitoterapic Dermo-ET 0.50÷3.00 %, Dermo-Oz 0.05÷1.50% si produsul fitoterapic Dermo-3FP 0.3÷1.00%, conditioнат sub formă de crema, utilizabil în terapia antiageing.**

**Formula de conditionare (crema antiageing de zi pentru grupa de varsta peste 45ani):**

*M. B. allez  
L. Popescu*

*829*

*L. Popescu*

30

*L. Popescu*

Nr. crt.	INCI	Cant.g/g %
1.	Cetearyl Glucoside	0.10-3.00
2.	Glyceryl Stearate	1.60-5.00
3.	Stearyl Alcohol	1.00-3.00
4.	Stearic acid	1.00-3.00
5.	Decyl Cocoate	1.00-3.00
6.	Caprylic/Capric Triglyceride	3.00-5.00
7.	Dimethicone	0.50-1.00
8.	Bisabolol	0.05-1.00
9.	<i>Trifolium pratense</i> extract (Dermo ET)	0.50-3.00
10.	<i>Viola tricolor</i> extract (Dermo 3FP)	0.30-1.00
11.	<i>Callendula officinalis</i> extract - Dermo-Oz	0.05-1.50
12.	Glycerin	3.00-5.00
13.	Aqua	Ad.100
14.	C 12-15 alkyl benzoate	3.00-8.00
15.	Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	0.30-0.40
16.	Xanthan Gum	0.10-0.30
17.	Sodium Hydroxide solution	0.10-0.50
18.	Octocrylene	2.00-5.00
19.	Parfum	0.10-0.30
20.	Phenoxyethanol (and) Potassium sorbat	0.50-1.00
21.	EDTA	0.05-0.20
22.	BHA	0.01-0.10

Datorita asocierii fitocompusilor biologic activi cu efecte complementare si cumulative, produsul dermatocosmetic prezinta **actiune antiageing** prin activitatea de tip **estrogen mimetica a Dermo-ET** in sensul stimularii ratei de proliferare celulara, restaurarea rezistentei mecanice prin structurarea fibrelor de colagen si inducerea expresiei integrinelor α2 responsabile de fermitatea tesutului cutanat, prin **regenerarea epidermala si remodelarea dermica indusa de Dermo-Oz** si prin **efectul fotoprotector**, inclusiv de inhibitie a angiogenezei declansate de radiatia UV indus in maniera cumulativa atat de **Dermo-3FP cat si de Dermo-ET**. Se recomanda in terapia imbatranirii pentru grupa de varsta peste 45ani.

**Exemplul de realizare nr. 3 : Produs dermatocosmetic**, continand ca substanțe biologic active produsul fitoterapic **Dermo-U 0.01÷0.5%**, produsul fitoterapic **Dermo-Oz 0.50÷1.50%** si produsul fitoterapic **Dermo-L**, conditionat sub formă de crema, utilizabil în terapia antiageing. **Formula de conditionare (crema antiageing de noapte pentru grupa de varsta sub 45 ani):**

Nr crt	INCI	Cant g/g %
1.	Aqua	Ad.100
2.	C 12-15 alkyl benzoate	1.00-5.00
3.	Caprylic/capric tryglyceride	3.00-6.00
4.	Squalane	3.00-6.00
5.	Glyceryl Stearate	1.00-3.00
6.	Glyceryl isostearate (and) Isostearyl alcohol (and) Brassica campestris sterols (and) Butyrospermum parkii butter (and) Candelilla wax	0.50-5.00
7.	Limnanthes Alba Seed Oil	1.00-8.00
8.	Glycerin	1.00-5.00
9.	Potassium Cetyl Phosphate	1.00-5.00
10.	Cetyl Alcohol	1.00-3.00
11.	Citromellyl methylcrotonate	0.10-0.50
12.	Phenoxyethanol (and) Potassium sorbat	0.60-1.00
13.	Sodium Hydroxide solution	0.10-0.50
14.	Carbomer	0.10-0.50
15.	Dimethicone	0.10-0.80
16.	Tocopherol	0.10-0.50
17.	Parfum	0.10-0.30
18.	BHA	0.05-0.20
19.	EDTA	0.05-0.20
20.	Salvia officinalis extract - Dermo-U	0.01-1.00
21.	Callendula officinalis extract - Dermo-Oz	0.05-1.50
22.	Medicago sativa extract - Dermo-L	1.00-5.00

Asocierea celor trei compusi cu efecte complementare si cumulative de: stimularea turn-overului celular si proteic, hidratare si regenerare epidermala, antioxidant fata de stimuli endogeni (**Dermo-U**); protectie celulara fata de actiunea UV (**Dermo L**); restaurarea fermitatii cutanate prin supraexpresia integrinelor  $\alpha 2\beta 1$  (**Dermo-U, Dermo Oz si Dermo L**); remodelare dermica si preventia depozitelor de proteine fibrilare dezorganizate(**Dermo Oz**) recomanda produsul pentru terapia antiageing, in special cea directionata catre fotoimbatranire.

**Exemplul de realizare nr. 4 : Produs dermatocosmetic, continand ca substanțe biologice active produsul fitoterapic Dermo-ET 0.5-5.0%, Dermo-Oz 0.05-1.50% si produsul fitoterapic Dermo-3FP 0.50-3.00%, conditioнат sub formă de gel sau lotiune, utilizabil ca produs de intretinere adjuvant în terapia antiageing. Formula de conditionare (GEL after shave):**

Nr crt.	INCI	Cantitate, g/g %
1.	Aqua	ad. 100
2.	Alcohol	3.00-10.00
3.	Glycerin	1.00-5.00
4.	Phenoxyethanol (and) Potassium sorbat	0.50-1.20
5.	PPG-26-Buteth-26 ( and) PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	1.00-5.00
6.	Carbomer	0.50-1.00
7.	Sodium hydroxide solution	0.50-1.00
8.	Polysorbate 80	0.30-0.50
9.	Parfum	0.10-0.50
10.	Allantoin	0.05-0.50
11.	Menthol	0.05-1.00
12.	Viola tricolor extract (Dermo 3FP)	0.50-3.00
13.	Trifolium pratense extract (Dermo ET)	0.50-5.00
14.	Callendula officinalis extract - Dermo-Oz	0.05-1.50
15.	Radix bardanae extract	1.00-5.00
16.	Galactomanan	0.10-0.50
17.	EDTA	0.08-0.20

**Formula de conditionare (LOTIUNE after shave):**

Nr. crt.	INCI	Cantitate, g/g %
1.	Aqua	ad 100
2.	Alcohol	5.00-10.00
3.	Glycerin	3.00-5.00
4.	Phenoxyethanol (and) Potassium sorbat	0.50-1.20
5.	PPG-26-Buteth-26 ( and) PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	1.00-5.00
6.	Sodium hydroxide solution	qs.
7.	Polysorbate 80	0.30-1.00
8.	Parfum	0.10-0.50
9.	Allantoin	0.10-0.50
10.	Menthol	0.05-1.00
11.	Viola tricolor extract (Dermo 3FP)	0.50-3.00
12.	Trifolium pratense extract (Dermo ET)	0.50-5.00
13.	Calendula officinalis extract - Dermo-Oz	0.05-1.50
14.	Radix bardanae extract	1.00-5.00
15.	Galactomanan	0.10-0.50
16.	EDTA	0.01-0.10

Fitocompuse biologic activi contribuie prin activitatea lor de tip dermorestitutiva (Dermo ET) si fotoprotectoare (Dermo 3FP), regenerativa la nivel dermo-epidermic (Dermo-Oz), antioxidantă (Dermo 3FP si Dermo ET) si antimicrobiana (Dermo 3FP) la completarea efectului calmant si de revigorare indus de un after-shave clasic cu actiuni terapeutice de tip antiageing si de refacere a structurilor cutanate afectate mecanic.

**Exemplul de realizare nr. 5 : Produs dermatocosmetic**, continand ca substanțe biologic active produsul fitoterapic **Dermo-Oz 0.1÷3.00%** si produsul fitoterapic **Dermo-O 0.02÷2.00%**, conditioнат sub formă de crema, utilizabil în refacerea tesutului cutanat expus la factori nocivi de mediu (variatii de temperatură si umiditate, detergenti, etc). **Formula de conditionare (crema de maini cu efect reparator):**

Nr. crt	INCI	Cantitate g/g %
1.	Aqua	Ad 100
2.	Paraffinum liquidum	3.00-10.00
3.	Glyceryl Stearate	1.00-3.00
4.	Lanolin	3.00-5.00
5.	Petrolatum	2.00-5.00
6.	Glycerin	2.00-5.00
7.	Isopropyl myristate	1.00-5.00
8.	Potassium Cetyl Phosphate	0.20-3.00
9.	Cetyl Alcohol	1.00-5.00
10.	Corylus avellana extract	0.20-3.00
11.	Triticum Vulgare Bran Extract	0.30-3.00
12.	Calendula Officinalis Extract - Dermo Oz	0.10-3.00
13.	Calendula Officinalis Extract - Dermo O	0.02-2.00
14.	Propylene Glycol (and) Diazolidinyl Urea (and) Methylparaben (and) Propylparaben	0.70-1.00
15.	Sodium Hydroxide solution	0.10-0.35
16.	Carbomer	0.10-0.35
17.	Dimethicone	0.50-2.00
18.	Tocopherol	0.10-0.50
19.	Parfum	0.10-0.30
20.	BHA	0.02-0.10
21.	EDTA	0.05-0.10

Principiile active ale acestei formule conferă produsului acțiune de restructurare dermica prin stimularea proliferării celulare și a sintezei de colagen, de hidratare și regenerare epidermala (**Dermo O**), precum și de remodelare a depozitelor de proteine fibrilare dezorganizate și de protecție față de stimuli oxidativi endogeni (**Dermo Oz**), fiind recomandată pentru protecția mainilor față de agresiunea factorilor de mediu.

**Exemplul de realizare nr. 6 : Produs dermatocosmetic**, conținând ca substanțe biologic active produsul fitoterapic **Dermo-ET 1.00÷4.00%**, produsul fitoterapic **Dermo-U 0.05÷2.00%**, produsul fitoterapic **Dermo - Oz 0.10÷1.00%**, produsul fitoterapic **Dermo - L 1.00÷5.00%** condiționat sub formă de crema, utilizabil **pentru refacerea structurilor dermo-epidermice degradate**.

**Formula de conditionare (crema de remodelare cutanată post-traumatică):**

Nr.crt.	Denumire INCI	Cant. g/g %
1.	Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate	1.00÷3.00
2.	Glyceryl Stearate	1.00÷3.00
3.	Stearyl Alcohol	1.00÷3.00
4.	Cetearyl Isononanoate	1.00÷6.00
5.	Caprylic/capric tryglyceride	3.00÷8.00
6.	Isopropyl Palmitate	1.20÷5.00
7.	Paraffinum liquidum	1.00÷5.00
8.	Squalane	1.00÷5.00
9.	Glycerin	1.00÷5.00
10.	Aqua	Ad 100
11.	Carbomer	0.10÷1.00
12.	Sodium Hydroxide solution	0.10÷1.00
13.	Parfum	0.08÷0.20
14.	Phenoxyethanol (and) Potassium sorbat	0.60÷1.00
15.	Trifolium pratense – Dermo-ET	1.00÷4.00
16.	Salvia officinalis extract – Dermo-U	0.05÷2.00
17.	Calendula Officinalis extract – Dermo-Oz	0.10÷1.00
18.	Arctium Lappa extract	2.00÷10.00
19.	Medicago sativa extract – Dermo-L	1.00÷5.00
20.	EDTA	0.01÷0.20

Produsul dermatocosmetic cumulează următoarele acțiuni: stimulare a turn-overului celular și proteic (**Dermo-U stimulează sinteza de colagen, Dermo-ET accelerează producerea de elastina**), expresie a integrinelor cu rol de menținere a legăturilor celula-matrix extracelular -efect de fermitate(**Dermo-U, Dermo-ET și Dermo Oz**), protecție și refacere celulară după acțiunea radiatiei UV (**Dermo-L și Dermo-ET**); remodelare a depozitelor de proteine fibrilare dezorganizate și regenerare epidermala (**Dermo Oz**), hidratare (**Dermo-U**) și efect antioxidant față de stimuli endogeni(**Dermo-U și Dermo-ET**). La acestea se adaugă și activitatea antimicrobiană și antiinflamatoare a extractului de brusture (Arctium lappa), produsul fiind recomandat sub formă de crema, cu precadere pentru preventia cicatricelor inestetice și favorizarea vindecării ranilor minore de diferite etiologii (arsuri solare, mici traumatisme, etc).

**Exemplul de realizare nr. 7 : Produs dermatocosmetic, conținand ca substanțe biologice active produsul fitoterapic Dermo-O 0.02÷2.00% și produsul fitoterapic Dermo-3FP 1.00÷6.00%, condiționat sub formă de lotiune, utilizabil pentru protecție solara fata de radiatia UV. Formula de conditionare (lotiune protecție solara):**

Nr crt	INCI	Cant g/g %
1.	Aqua	Ad 100
2.	Acrylates/C 10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	0.10÷0.50
3.	Sodium Hydroxide solution	0.15÷0.50
4.	EDTA	0.05÷0.10
5.	Zinc Oxide (and) Simmondsia Chinensis (Jojoba) Seed Oil (and) Glyceryl Isostearate (and) Polyhydroxystearic Acid	1.00÷15.00
6.	Ethyhexyl salicylate	1.00÷5.00
7.	Octocrylene	1.00÷5.00
8.	Ethyhexyl methoxycinnamate	1.00÷10.00
9.	Stearic acid	1.00÷3.00
10.	Glyceryl stearate	1.00÷3.00
11.	Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate	2.00÷5.00
12.	C 12-15 alkyl benzoate	3.00÷8.00
13.	Isononyl Isononanoate	3.00÷8.00
14.	Caprylic/capric triglyceride	3.00÷8.00
15.	Isopropyl Palmitate	4.00÷8.00
16.	Glycerin	1.00÷5.00
17.	Parfum	0.10÷0.20
18.	Diazolidinyl urea (and) methylparaben (and) propylparaben (and) Propylene glycol	0.50÷1.00
19.	Triticum aestivum extract	1.00÷3.00
20.	Viola tricolor extract (Dermo 3FP)	1.00÷6.00
21.	Centaurea cyanus extract	1.00÷6.00
22.	Calendula Officinalis Extract - Dermo O	0.02÷1.00

Protectia celulara fata de radiatia UV indusa de compusul **Dermo-3FP** este asociata in aceasta formula cu raspunsul antioxidant la stimuli endogeni, stimularea sintezei de colagen, regenerarea epidermala si hidratarea generate de activitatea **Dermo-O**, si de asemenea si cu extracte cu efecte fotoprotectoare adjuvante (*Centaurea cyanus si Triticum aestivum*), precum si cu factori de protectie clasici (*Ethyhexyl methoxycinnamate* ), obtinandu-se un produs recomandat in cazul expunerii solare prelungite, pentru evitarea efectelor nocive ale radiatiei UV.

**Exemplul de realizare nr. 8 : Produs dermatocosmetic, conținand ca substanțe biologice active produsul fitoterapic Dermo-ET 1.00÷4.00% și produsul fitoterapic Dermo - Oz 0.10÷1.00%, asociate cu produse fitoterapice din brusture (*Arctium lappa*) si alun (*Corylus avellana*) sau albastrele (*Centaurea cyanus*), condiționat sub formă de crema, inclusiv in varianta ce contine ingrediente naturale / organice, utilizabil in terapia antiacneica.**

**Formula de conditionare (crema antiacneica de zi cu efect de remodelare cictriala): -**

Nr.crt.	INCI	Cant. g/g %
1.	Aqua	Ad 100
2.	Mica	5.00-10.00
3.	Parfum	1.00-5.00
4.	Macadamia Integrifolia Seed Oil	0.05-0.20
5.	Simmondsia Chinensis Seed Oil	5.00-10.00
6.	Bisabolol	5.00-10.00
7.	Water (and)Potassium sorbate (and)Sodium benzoate	0.10-0.20
8.	Dimethylsorbide	0.20-0.90
9.	Corylus avellana extract	0.50-5.00
10.	Arctium lappa extract	0.50-4.00
11.	Trifolium pratense extract (Dermo-ET)	1.00-5.00
12.	Citric acid	q.s.
13.	Calendula Officinalis extract - Dermo-Oz	0.10-1.00

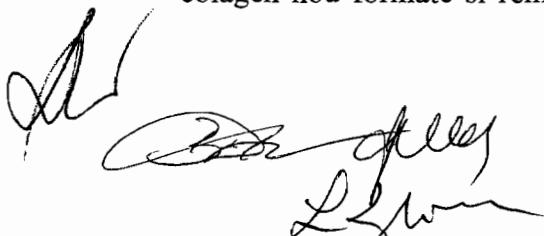
**Formula de conditionare (crema antiacneica de zi cu efect de remodelare cicatriciala): -**  
**varianta BIO**

Nr.crt.	INCI	Cant. g/g %
1.	Aqua	Ad 100
2.	Mica	1.00-15.00
3.	Lavandula Angustifolia Angustifolia Herb Oil	0.05-0.10
4.	Melaleuca Alternifolia Leaf Oil	0.05-0.20
5.	Macadamia Integrifolia Seed Oil	5.00-10.00
6.	Simmondsia Chinensis Seed Oil	5.00-10.00
7.	Bisabolol	0.10-0.20
8.	Water (and)Potassium sorbate (and)Sodium benzoate	0.20-0.60
9.	Centaurea cyanus flower extract	0.50-4.00
10.	Arctium lappa extract	1.00-5.00
11.	Trifolium pratense extract	1.00-5.00
12.	Calendula Officinalis extract - Dermo-Oz	0.10-1.00

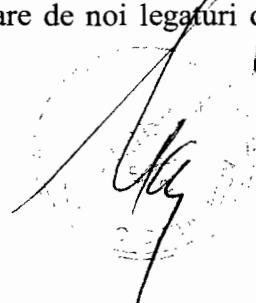
Efectul modulator al dezechilibrelor hormonale indus de compusul **Dermo-ET** este asociat in aceasta formula cu cel de remodelare a depozitelor de proteine fibrilare dezorganizate si regenerare epidermala (**Dermo Oz**), precum si cu efectele antiinflamatoare si antimicrobiene adjuvante ale extractelor de *Arctium lappa*, respectiv *Corylus avellana sau Centaurea cyanus* pentru varianta BIO, obtinandu-se un produs recomandat in terapia antiacneica, avand avantajul unei actiuni complementare de preventie a formarii cicatricilor.

## REVENDICARI

1. Asocierea dintre produsul fitoterapic **Dermo-U** din **Folium Salviae**, produsul fitoterapic **Dermo-3FP din herba Viola tricolor** si produsul fitoterapic **Dermo L**, izolat din **herba Medicago sp.**, care prin cumularea actiunilor principiilor active la nivel de celula tinta, confera produsului dermatocosmetic final proprietati dermo-restitutive, de refacere a fermitatii tesutului cutanat, hidratante, antiinflamatoare, antioxidantane si fotoprotectoare.
2. Asocierea dintre produsul fitoterapic **Dermo ET**, izolat din **Herba Trifolii**, produsul fitoterapic **Dermo Oz** izolat din **herba de Calendula**, si produsul fitoterapic **Dermo-3FP din herba Viola tricolor** in vederea obtinerii unei actiuni anti-ageing prin urmatoarele mecanisme: estrogen mimetic, refacerea fermitatii dermice prin supraexpresia integrinelor  $\alpha 1\beta 1$  si  $\alpha 2\beta 1\alpha$  molecule de adeziune intre fibroblast si matricea celulara, regenerare epidermala si remodelare a depozitelor de colagen imperfecte, antioxidantane, antiinflamatoare si fotoprotectoare.
3. Asocierea dintre produsul fitoterapic **Dermo-U** din **Folium Salviae**, produsul fitoterapic **Dermo Oz** izolat din **herba de Calendula**, si **Dermo-3FP din herba Viola tricolor**, in vederea obtinerii unui efect antiageing cumulativ prin accelerarea turn-overului celular si proteic (colagen), regenerare epidermala si remodelare a depozitelor fibrilare imperfecte, restabilirea fermitatii prin legaturi de tip celula – matrice extracelulara, protectie celulara fata de actiunea radiatiei UV.
4. Asocierea dintre produsele fitoterapice **Dermo Oz si Dermo-O** izolate din **herba de Calendula**, in vederea refacerii tesutului cutanat expus agresiunii factorilor de mediu (variatii de temperatura si umiditate, detergenti, etc) prin regenerare epidermala si remodelare a depozitelor de colagen imperfecte simultan cu accelerarea sintezei proteice, hidratare si restabilirea fermitatii cutanate.
5. Asocierea multipla dintre produsele fitoterapice **Dermo ET** izolat din **Herba Trifolii**, **Dermo-U din Folium Salviae**, **Dermo Oz din herba de Calendula** si **Dermo L** din **herba Medicago sp.** in vederea refacerii structurilor dermo-epidermice degradate, preventia cicatricelor inestetice si favorizarea vindecarii ranilor minore de diferite etiologii prin accelerarea proliferarii celulare si a sintezei de colagen si elastina, maturarea fibrelor de colagen nou formate si remodelarea depozitelor imperfecte, formare de noi legaturi de tip



SBY



KG



celula-matrix extracelular, hidratare si regenerare epidermala, efect antiinflamator si protectie celulara antioxidantă.

6. Asocierea dintre produsul fitoterapic **Dermo-O** din **herba de Calendula** si produsul fitoterapic **Dermo-3FP din herba Viola tricolor** pentru o protectie celulara efectiva fata de ratiatia solara prin preventia foto-imbatranirii prin stimularea turn-over-ului moleculelor cheie implicate in functia de sustinere a tesutului conjunctiv dermal, efect de hidratare si regenerare epidermica, precum si actiune antiinflamatoare, anti-apoptotica si anti-angiogenica in conditiile iradierii UV.

7. Asocierea dintre produsele fitoterapice **Dermo ET** izolat din **Herba Trifolii** si **Dermo Oz** din **herba de Calendula** destinata modularii dezechilibrelor hormonale si preventiei formarii cicatricelor caracteristice patologiei acneice prin mecanisme conjugate de tip estrogen mimetic si de regenerare a stratului corneum.

8. **Produse dermatocosmetice de tip antiageing**, continand ca substanțe biologic active produsele fitoterapice asociate, definite în revendicarea 1-7, condiționate sub formă de cremă, gel sau lotiune.

9. **Produse dermatocosmetice de tip regenerator / restitutiv**, continand ca substanțe biologic active produsele fitoterapice asociate, definite în revendicarea 1-7, condiționate sub formă de cremă.

