



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00618**

(22) Data de depozit: **23/08/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/07/2017** BOPI nr. **7/2017**

(41) Data publicării cererii:  
**30/08/2013** BOPI nr. **8/2013**

(73) Titular:  
• **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;**  
• **NIȚĂ ROXANA ANDREEA, STR.PRAVĂȚ  
NR.20, BL.P 9, SC.7, ET.4, AP.140,  
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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**L. OLARIU ȘI COL., "ESTROGEN-LIKE  
EFFECT OF SOME PHYTOCOMPOUNDS  
FROM TRIFOLIUM PRATENSE FOR  
MODULATION OF DERMAL  
FIBROBLASTS PHYSIOLOGY",  
<http://biotehnos.com/Proiect%20diseminare/FEBS%20Biotehnos.pdf>, 2011,  
B. DUMITRIU ȘI COL., "THERAPEUTIC  
STRATEGIES FOR INNOVATIVE  
ANTI-AGEING COSMECEUTICALS,  
BASED ON FULLY EXPLOITATION O  
THREE SPECIES OF ROMANIAN  
MEDICINAL PLANTS",  
<http://biotehnos.com/Proiect%20diseminare/Euroinvent%20Dermolab%20.pdf>, 2012, RO 116871 B**

(54) **PRODUS FITOTERAPEUTIC DERMATOCOSMETIC  
CU ACȚIUNE CUMULATĂ ÎN PERTURBĂRI INFLAMATORII  
CUTANATE, ȘI PROCEDEU DE PREPARARE A ACESTUIA**



# RO 128710 B1

1 Prezenta invenție se referă la un produs fitoterapeutic dermatocosmetic cu acțiune  
cumulată în perturbări inflamatorii cutanate, de restructurare dermică, fotoprotectoare, antiinfla-  
3 matoare la nivel vascular și anti-permeabilizare vasculară, și la un procedeu de preparare a  
acestui.

5 Eficiența extractelor selective obținute din plante, conform invenției, a fost dovedită prin  
studii la nivel de celulă țintă, pe linii celulare standardizate, relevante pentru mecanismul studiat:  
7 HUVEC (celule endoteliale de venă ombilicală umană) datorită relevanței acesteia în simularea  
procesului inflamator la nivel de vas sanguin, fibroblaste dermice umane (HS 27) pentru efectul  
9 de restructurare dermică (sinteza colagenului din matricea extracelulară, expresia unor  
molecule de adeziune celulă - proteină structurală, modularea factorului homeostatic TGFβ-  
11 etc.), keratinocite umane normale - linia HaCaT, cu funcție de barieră față de acțiunea nocivă  
a radiației UV și evidențierea efectului antiapoptotic, antiinflamator, antiangiogenic, etc.

13 Majoritatea proceselor patofiziologice din organism reprezintă un cumul de factori  
declanșatori și procese biologice complexe care stau la baza instalării acestora. Astfel, celulita  
15 este o afecțiune dermatocosmetică cu un grad mare de complexitate, implicând procese  
inflamatorii în sistemul circulator și limfatic, modificări structurale ale matrixului extracelular,  
17 exces de țesut adipos subcutanat datorat perturbărilor metabolismului lipidic (creșterea  
lipogenezei și încetinirea lipolizei), **Tamara Al-Bader, Adam Byrne, Johanna Gillbro, Andrea**  
19 **Mitarotonda, Adeline Metois, Francis Vial, Anthony V. Rawlings, Aurelie Laloeuf, „Effect**  
21 **of cosmetic ingredients as anticellulite agents: synergistic action of actives with in vitro**  
23 **and in vivo efficacy”, Journal of Cosmetic Dermatology, 11, 17-26, 2011; Khan MH, Victor**  
25 **F, Rao B et al. „Treatment of cellulite: part I. Pathophysiology”, J Am Acad Dermatol;**  
27 **62:361-70; 2010.** Prin urmare, în tratamentul eficient al acestei afecțiuni trebuie intervenit atât  
prin reducerea adipogenezei, cât și prin stoparea inflamației vasculare și restructurarea  
29 dermului afectat de inserțiile de adipocite, **Rawlings A. V., „Cellulite and its treatment”,**  
31 **International Journal of Cosmetic Science, 28, 175-190, 2006.** Un alt proces inflamator aflat  
la granița dintre terapie și realizarea unui confort personal prin produsele de îngrijire dermato-  
33 cosmetice îl reprezintă senzația de „picioare obosite” sau „grele”, unul dintre primele simptome  
ale bolilor periferice vasculare, **Pedro Contreiras Pinto 1 and Luis Monteiro Rodrigues, „An**  
35 **Experimental in Vivo Model to Characterize "Heavy Legs" Symptom in Topical**  
37 **Formulations Hindawi Publishing Corporation, Dermatology Research and Practice,**  
39 **Volume 2009, Article ID 547039, 5 pag.** Dintre acestea, insuficiența cronică venoasă afectează  
aproape 40% din populația țărilor dezvoltate. În progresia acestei patologii există o creștere a  
fluxului microcirculator sanguin care cauzează dilatarea capilarelor, inducând hipertensiune  
41 venoasă, dar și tulburări de permeabilitate vasculară, propagarea inflamației prin cascadă de  
citokine extracelulare, stimularea moleculelor de adeziune, cât și modificări la nivel dermic,  
43 legate de matricea extracelulară cu rol suport pentru microvasculatură, **Raffetto JD, „Dermal**  
45 **pathology, cellular biology, and inflammation in chronic venous disease”, Thromb Res.**  
**123 Suppl4: S66-71, 2009; Ferdinando Mannello, Joseph D. Raffetto, „Matrix**  
**metalloproteinase activity and glycosaminoglycans in chronic venous disease: the**  
**linkage among cell biology, pathology and translational research”, Am J Transl Res; 3(2):**  
**149-158, 2011.** Astfel, calea optimă de intervenție este acțiunea concertată atât la nivel de vas  
sanguin, proces inflamator endotelial și restructurare dermică prin inhibiție de matrix metalo-  
proteinaze (exemplu: MMP 9 este implicată în remodelarea tisulară venoasă), și accelerarea  
biosintezei proteice.

Cearcănele sau hiperchromia periorbitală reprezintă o altă manifestare fiziopatologică de tip inflamator, cauzată, în principal, de melanizarea dermică și/sau congestia hemodinamică post inflamatorie, **Epstein J. S. „Management of infraorbital dark circles”. Arch. Facial Plast Surg 1: 303-7, 1999.** Cu toate acestea, studii histologice au evidențiat o slabă corelare între ameliorarea cearcănelor și reducerea melanozei, ceea ce sugerează o cale de intervenție terapeutică diferită de cea a modulării cantității de melanină. Există factori de mediu și congenitali care converg la apariția cearcănelor, printre care: radiația UV, îmbătrânirea cronologică, stresul psihic și emoțional, reacții alergice și atopice, chiar și dezechilibrul estrogenic, toate acestea fiind convergente către eliberarea de mediatori ai inflamației (citokine, factori proteici de semnalizare) ce afectează permeabilitatea vasculară, **Williams I. R, Kupper T. S. „Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system”, Life Sci, 58: 1485-507, 1996; Samara Eberlin, Maria Del Carmen Velazquez Pereda, Gustavo de Campos Dieamant, Cecilia Nogueira, Rejane Maria Werka, Mary Luci de Souza Queiroz, „Effects of a Brazilian herbal compound as a cosmetic eyecare for periorbital hyperchromia”, Journal of Cosmetic Dermatology, 8, 127-135, 2009.** Agenții antiinflamatori frecvent utilizați în produsele dermatologice sunt compușii steroidici de tipul corticosteroidilor, cum sunt dexametazona, hidrocortizonul, triamicinolona, singuri sau asociați; dar, datorită efectelor sistemice adverse ce le provoacă, sunt din ce în ce mai evitați. De asemenea, utili pentru efectul antiinflamator sunt compușii ce includ substanțele nesteroidiene de tipul: piroxicam, tenoxicam, diclofenac, indometacin, fenamat, ibuprofen, naproxen, ketoprofen, fenilbutazonă, toți compuși obținuți prin sinteza chimică.

Pentru primele stadii de evoluție ale edemelor vasculare periferice, acțiunea concertată la nivel de vas sanguin și țesut cutanat se referă la restructurarea dermică prin inhibiție de matrix metaloproteinaze și accelerarea biosintezei proteice, asociată cu stoparea procesului inflamator vascular în ansamblul său, inclusiv a permeabilizării vasculare prin inhibiția VEGF.

Tendința actuală o reprezintă înlocuirea agenților terapeutici de sinteză cu cei naturali, obținuți din lumea vegetală, a microorganismelor, sau animală, care, deși au de obicei o activitate farmacologică mai scăzută, sunt mai eficienți la utilizarea pe termen lung, datorită siguranței la administrare, fiind de obicei lipsiți de reacții adverse majore. Documentele oficiale la nivel european din ultimul timp, Codul Alimentar Austriac - Ed.IV-09.06.2011 - cap. 6. Cosmetice ecologice, impun noi reglementări legate de utilizarea numai a ingredientilor naturali, obținuți prin metode/procedee simple ecologice, fiind interzisă folosirea substanțelor de aromatizare, colorare sau cu efect antioxidant, obținute prin sinteza chimică.

Există numeroase studii care evidențiază efectele biologice ale saponinelor asupra organismelor superioare. Astfel, saponinele măresc permeabilitatea membranelor celulare, formând pori, **George Constantine, Linnea D. Thompson, "The Natural Pharmacy: Complete A-Z Reference to Natural Treatments for Common Health Conditions" - Ed.Three Rivers Press - ed.a III-a.** Se pare că acțiunea hemolitică a saponinelor este rezultatul afinității agliconului pentru sterolii membranari, în principal colesterol, cu care formează complexe insolubile. Cantitatea de glicozide necesară pentru permeabilizare este mult mai mică pentru straturile lipidice bogate în colesterol decât pentru cele fără colesterol membranar, **George Francis; British Journal of Nutrition, 88, 587-605, 2002.** În general, saponinele au fost studiate pentru beneficiile legate de scăderea colesterolului, stimularea imunității și inhibarea celulelor canceroase. Studiile realizate au evidențiat blocarea colesterolului în intestin, atât a celui alimentar, cât și a celui produs în ficat, și eliminarea acestuia fără a fi resorbit.

Complexul de saponine triterpenice existent în planta *Hedera helix* (iederă), familia *Araliaceae*, are ca aglicon predominant hederagenina, alături de acidul oleanolic.

# RO 128710 B1

1 Experimente de eficacitate a tratamentului insuficienței venoase cu diferite saponine și  
sapogenine separate din *Hippocastani semen* și *Hedera helix* au fost realizate *in vitro*, prin  
3 inhibiția enzimelor specifice, **Gogelein H; Biochimica et Biophysica Acta; 773, 32-34, 1984.**  
Astfel, doar sapogeninele din *Hedera helix* - hederagenina și acidul oleanolic - au prezentat o  
5 inhibiție non-competitivă a hialuronidazei, dependentă de concentrație. Același comportament  
l-au avut și față de elastază.

7 Pe plan mondial, se cunosc o serie de brevete și cereri de brevet de invenție care au  
ca scop obținerea unor produse bioactive vegetale cu activitate terapeutică pe bază de *Hedera*  
9 *helix* utilizate pentru diferite efecte biologice: inhibitori ai diviziunii și creșterii celulare neavând  
efect mitoclastic, antifungică și antiparazitară, adjuvant în tratamentul diferitelor forme de  
11 leucemie, sau ca djuvant în prepararea vaccinurilor.

Sunt cunoscute diferite produse cosmetice cu acțiune anticelulitică și antiedematoasă,  
13 obținute prin asocierea cu extracte de *Hedera helix*, *Ruscus aculeatus*, *Aesculus*  
*hippocastanum*, cu extracte de cola - **EP 0450669**, cu un amestec de saponine extrase din  
15 *Arnica montana*, nuca de cola, *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum* și *Ruscus aculeatus* -  
**FR 2499405**.

17 Brevetul **US 4569839**, ce se referă la o compoziție cosmetică pentru tratamentul părului  
și pielii, utilizează un amestec de pulberi de plante, printre care se găsește și *Hedera helix*,  
19 pentru efectul antipruriginos.

**US 4795638** brevetează o compoziție de subțiere sau de reducere a celulitei, ce conține  
21 un ingredient cu acțiune lubrifiantă, precum și cel puțin un extract liposolubil din diferite plante,  
printre care se află și iedera, utilizat în proporție de 5...50%; se menționează faptul că extractul  
23 de iederă este obținut prin îmbibarea plantei timp îndelungat în propilenglicol; nu se dau date  
referitoare la compoziția chimică și nici nu sunt prezentate teste de evidențiere a acțiunii  
25 specifice.

Pentru obținerea unor produse de îngrijire intimă, **US 6911228** brevetează utilizarea unui  
27 agent astringent ales dintr-o suită de plante, printre care se află și *Hedera helix*, ce poate fi  
microîncapsulat într-un material spongios; nu se dau date cu privire la extractul de iederă  
29 utilizat.

**US 5972340** brevetează o cremă cu efect de subțiere ce conține mai multe plante:  
31 iederă, coada calului, schinduf, nalbă, alge, ulei de germeni de grâu; se menționează utilizarea  
extractului de iederă în concentrația de 0,8...8% în produsul final, datorită principalelor compo-  
33 nente, estrogenii și hederina, fără să se ofere date referitoare la compoziția chimică cantitativă.

**DE 102004032837** descrie un preparat cosmetic anticelulitic ce conține bioquinone și  
35 izoflavonoide, preferabil genisteina, al cărui mecanism de acțiune nu este bine lămurit,  
presupunându-se că efectul este datorat îmbunătățirii metabolismului celular.

37 **JP 200004481 A** descrie un preparat de uz extern, cu activitate de inhibare a inflamației  
prin combinarea mai multor plante, printre care și *Hedera helix* și *Aesculus hippocastanum*.

39 Brevetul **RO 121004 B1** prezintă o compoziție cosmetică cu acțiune anticelulitică și de  
redresare a depunerilor adipoase, cu extracte vegetale din *Hedera helix*, *Vitis vinifera* și  
41 *Origanum vulgare*. Preparatul cosmetic conține între 5...10 părți extract hidroalcoolic de *Hedera*  
*helix*, caracterizat prin minimum 2% substanță uscată și minimum 0,15% saponine triterpenice,  
43 3...8 părți extract hidroalcoolic de *Vitis vinifera*, caracterizat prin conținutul de minimum 2,5%  
substanță uscată și 70% proantociani și 50% taninuri catehice, și 2...7 părți extract hidroalcoolic  
45 de *Origanum vulgare* ce conține minimum 3% substanță uscată, minimum 0,3% flavone și  
minimum 0,15% taninuri. Se menționează faptul că produsul cosmetic, datorită complexului  
47 bioactiv vegetal, are efect de reducere a depunerilor adipoase și a celulitei, asigurând hidratarea  
pielii și stopând și procesul de îmbătrânire al acesteia, fără să fie prezentate testele și  
49 rezultatele testelor ce evidențiază eficacitatea acestuia.

Lucrarea „**Estrogen-like effect of some phytochemicals from *Trifolium pratense* for modulation of dermal fibroblasts physiology**”, FEBS 2011, B. Dumitriu, prezintă efectul extractului de trifoi ca restructurant dermic, prin mecanismul creșterii indicelui proliferativ și sinteza de ADN, fără a fi dezvăluită compoziția chimică standardizată a extractului, și anume concentrația procentuală a substanțelor active, fiind precizată doar prezența compușilor izoflavonici existenți în materia primă plantă (aproximativ 0,17%).

În lucrarea “**Therapeutic strategies for innovative anti-ageing cosmeceuticals, based on fully exploitation of three species of Romanian medicinal plants**”, B. Dumitriu, L. Olariu, L. Zglimbea, este menționat extractul Dermo ET, cu acțiune de restructurare a organizării fibrilare pentru vindecarea leziunilor superficiale și, respectiv, cu efect estrogen-like.

Din brevetul **RO 116871 B** este cunoscut un procedeu de obținere a extractelor bioactive, sub formă liofilizată, din plante, utilizabile în produse cosmetice, din *Radix Bardanae*, *Herba Hyperici*, *Hippocastani semen*, realizat printr-o operație de extracție a materialului vegetal, la fierbere, într-un reactor prevăzut cu agitare și încălzire cu abur, separarea extractului obținut prin filtrare, concentrare sub vid, pasteurizare, condiționare și stabilizare finală, prin liofilizare, obținându-se un preparat utilizabil ca intermediar bioactiv, în produse cosmetice și farmaceutice, datorită acțiunilor farmacologice: antiinflamatoare, emoliente, regeneratoare tegumentare.

Efectul restructurant al extractului de *Trifolium pratense* este demonstrat conform prezentei invenții și prin mecanismele de: stimulare a sintezei de colagen și a ratei de multiplicare celulară, precum și inducere a supraexpresiei integrinelor  $\alpha 1\beta 1$  și  $\alpha 2\beta 1$  (refacerea fermității structurilor dermo-epidermice).

Din datele prezentate cu privire la stadiul tehnicii în domeniul obținerii de compoziții cosmetice cu efecte anticelulitice, pe bază de extracte vegetale, rezultă următoarele dezavantaje:

- în general, pentru obținerea unui efect anticelulitic, se folosește extractul de iederă - sub formă hidroalcoolică sau uleioasă - singur sau asociat cu alte extracte din alte plante decât cele utilizate în brevetul de față: *Ruscus aculeatus*, cola, arnica montană - **EP 0450669**, **FR 2499405**, nalbă, coada calului, schinduf, ulei de germeni de grâu - **US 5972340**, *Vitis vinifera*, *Origanum vulgare* - **RO 121004 B1**;

- extractele de *Hedera helix* utilizate de obicei nu sunt standardizate sau caracterizate chimic, iar atunci când se prezentate date - **RO 121004 B1** - concentrația substanței active este foarte mică, 0,15% saponine triterpenice, de cele mai multe ori precizându-se doar raportul utilizat în produsul cosmetic;

- de obicei, acțiunea biologică prin teste specifice sau mecanismul de acțiune al compușilor/extractelor utilizate nu sunt dovedite științific.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția de față constă în prepararea unui produs dermatocosmetic fitoterapeutic pe bază de extracte standardizate în mai multe componente active, cu acțiuni biologice complementare: restructurare dermică, fotoprotectoare, antiinflamatoare la nivel vascular și antipermeabilizare vasculară, în vederea eficientizării aplicațiilor terapeutice ale acestora.

Într-un prim aspect, soluția propusă în prezenta invenție constă într-un produs dermatocosmetic pe bază de principii active din plante utilizabile în terapia antiinflamatoare cutanată asociată edemelor vasculare periferice, hiperchromiei periorbitale și în afecțiuni de tip lipodistrofic, care este constituit prin asocierea a 5,00...12,00% extract selectiv din *Herba Trifolii*, 0,10...0,70% extract selectiv din *Hippocastani semen*, 1,00...2,00% extract selectiv din *Folium Hederæ Helicis*, 0,10...2,50% extract selectiv din *Herba Cyani* și 1,00...5,00% extract selectiv din *Radix Bardanae* asociate cafeinei, condiționate sub formă de cremă, ser sau gel.

# RO 128710 B1

1            Produsul dermatocosmetic menționat mai sus conține extractul selectiv izolat din *Folium*  
2 *Hederae Helicis* condiționat fie sub formă de extract fluid în glicerină, propilenglicol sau  
3 butilenglicol, standardizat în acizi polifenol carboxilici exprimați în acid cafeic de minimum  
4 0,3 g/100 g și în saponine triterpenice totale exprimate în hederacozida C de minimum  
5 3 g/100 g, obținut în raport 1:1...1:2 (g/g) plantă:extract final, sau sub formă de extract uscat,  
6 pulbere alb-cafenie, nehigroscopică, standardizat în saponine triterpenice exprimate în  
7 hederacozida C de minimum 60%, obținut în raport 20:1 (g/g) plantă:extract final.

8            De asemenea, produsul dermatocosmetic menționat mai sus conține extractul selectiv  
9 izolat din *Hippocastani semen*, condiționat fie sub formă de extract fluid, în glicerină, pro-  
10 pilenglicol sau butilenglicol, standardizat în proantociani de minimum 0,15 g/100 g și saponine  
11 triterpenice totale exprimate în escina de minimum 2 g/100 g, obținut în raport 1:1 (g/g)  
12 plantă:extract final; sau sub formă de extract uscat, pulbere galben-cafenie nehigroscopică,  
13 standardizat în saponine triterpenice exprimate în escina de minimum 70%, și în flavonoide de  
14 minimum 2% obținut în raport 33:1 (g/g) plantă:extract final.

15            De asemenea, produsul dermatocosmetic menționat mai sus conține extractul selectiv  
16 izolat din *Radix Bardanae* condiționat sub formă de extract fluid în glicerină, propilenglicol sau  
17 butilenglicol, standardizat în acizi polifenol carboxilici exprimați în acid cafeic de minimum  
18 0,3 g/100 g, obținut în raport 1:1 (g/g) plantă:extract final.

19            De asemenea, produsul dermatocosmetic menționat mai sus conține extractul selectiv  
20 izolat din *Herba Trifolii* condiționat sub formă de extract fluid în glicerină, propilenglicol sau  
21 butilenglicol, standardizat în compuși flavonoidici exprimați în quercetina de minimum  
22 0,15 g/100 ml și în agliconii izoflavonici de minimum 0,23 g/100 ml ca sumă a daidzeinei, geni-  
23 steinei, formononetinei și biochaninei A, și anume: daidzeina minimum 10 mg/100 ml, genisteina  
24 minimum 20 mg/100 ml, formononetina minimum 140 mg/100 ml și biochanina A minimum  
25 60 mg/100 ml, obținut în raport 2:1...1:1 (g/g) plantă:extract final.

26            De asemenea, produsul dermatocosmetic menționat mai sus conține extractul selectiv  
27 izolat din *Herba Cyani*, condiționat sub formă de extract fluid în glicerină, propilenglicol sau  
28 butilenglicol, standardizat în acizi polifenol carboxilici exprimați în acid cafeic de minimum  
29 0,9 g/100 g și în compuși flavonoidici exprimați în rutin de minimum 0,5 g/100 g, obținut în raport  
30 1:1...1:2 (g/g) plantă:extract final.

31            Într-un alt aspect, invenția se referă la un procedeu de preparare a unui produs derma-  
32 tocosmetic pe bază de principii active din plante definit mai sus, în care materiile prime vegetale  
33 uscate și mărunțite se supun unei operații de extracție primară, la temperatura camerei, timp  
34 de 6...48 h, prin macerare dinamică, cu alcool etilic de concentrație 40...96%, soluțiile extractive  
35 obținute se supun prelucrării prin operații de decolorare cu cărbune activ în proporție de  
36 0,1...1 g/100 ml soluție extrasă, concentrare sub vid și condiționare în glicerină, propilenglicol  
37 sau butilenglicol, obținându-se extractele selective fluide sau după etapa de concentrare sub  
38 vid, produsul obținut se supune unei separări selective cu n-butanol sau acetat de etil, în raport  
39 de 1:3...1:10, extractele organice se concentrează sub vid până la reziduu uscat în curent de  
40 aer cald la 50...60°C cu obținerea unor extracte uscate, urmată de asocierea a 5,00...12,00%  
41 extract selectiv din *Herba Trifolii*, 0,10...0,70% extract selectiv din *Hippocastani semen*,  
42 1,00...2,00% extract selectiv din *Folium Hederae Helicis*, 0,10...2,50% extract selectiv din *Herba*  
43 *Cyani* și 1,00...5,00% extract selectiv din *Radix Bardanae* asociate cafeinei, și condiționate sub  
44 formă de cremă, ser sau gel.

45            Pe baza produsului dermatocosmetic fitoterapeutic, se obține o gamă de cosmetice prin  
46 asocierea extractelor selective fitoterapeutice a căror acțiune biologică, dovedită prin teste  
47 specifice, cumulează efectele de refacere a structurilor dermice, antiedematos și antiinflamator,  
48 și anume:

- 49            - cremă și gel anticelulitic;
- 50            - gel și cremă cu efect antiedematos;
- 51            - ser și cremă anticearcăne.

# RO 128710 B1

Componentele cosmetice active obținute din *Herba Trifolii*, *Folium Hederae Helicis*, *Hippocastani semen*, *Radix Bardanae*, *Herba Cyani Testele* au fost testate în vederea evidențierii activității specifice și evaluării aplicațiilor în terapeutică, testele efectuate fiind redată în continuare.

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

- *efectul antiinflamator la nivel de endoteliu vascular* s-a evidențiat pe linia specifică HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) datorită relevanței acesteia în simularea procesului inflamator la nivel de vas sanguin;

- *efectul de restructurare dermică* s-a testat pe fibroblaști dermici umani (HS 27), principalul tip celular responsabil de sinteza proteinelor structurale din matrixul extracelular, dintre care cele mai importante sunt colagenul de tip I și III.

- *efectul fotoprotector*, s-a demonstrat pe linia de keratinocite umane HaCaT, acest tip de celule formând epidermul, primul strat al țesutului cutanat, cu funcție de barieră față de acțiunea nocivă a radiației UV.

### *Demonstrarea efectului restructurant dermic a extractului de Herba Trifolii*

Efectul s-a evidențiat pe culturi de fibroblaști dermici umani (linie celulară selectivă pentru efectul urmărit), prin date complementare la nivelul următoarelor mecanisme: stimularea sintezei de colagen și a ratei de multiplicare celulară, precum și inducerea supraexpresiei integrinelor  $\alpha 1\beta 1$  și  $\alpha 2\beta 1$  (refacerea fermității structurilor dermo-epidermice).

Extractul de *Herba Trifolii* 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.

#### a) Stimularea sintezei de colagen

Degradarea colagenului din matricea extracelulară se datorează în mare parte activității proteolitice a metaloproteinazelor (MMP-uri) ce sunt exprimate atât de fibroblastele dermice, cât și de celulele inflamatorii, având un rol important în remodelarea matriceală de la nivelul pielii supuse unui proces inflamator de lungă durată ce are drept consecință pierderea integrității matricei cu diminuarea elasticității pielii, **Silva C. G., Raulino R. J., Cerqueira D. M., Mannarino S. C., Pereira M. D., Panek A. D., Silva J. F., Menezes F. S., Eleutherio E.C.; Phytomedicine. Aug; 16(8): 761-7, 2009.** Matrix metaloproteinazele (MMP-uri) sunt puțin exprimate constitutiv în țesuturile normale ale adulților, însă sunt supraexprimate de citokinele sau factorii de creștere în procesele fiziologice și patologice. Reglarea matricei extracelulare implică un echilibru între sinteza componentelor sale structurale și degradarea lor sub acțiunea catalitică a MMP-urilor a căror funcție biologică este modulată de inhibitori tisulari specifici (TIMP). Datele experimentale obținute demonstrează că fitohormonii studiați induc asupra celulelor fibroblastice atât biosinteza colagenului de tip I și III, cât și inactivarea enzimei proteolitice MMP9, ajutând astfel la remodelarea matriceală corectă a zonei afectate.

Substanța		Colagen $\mu\text{g OH-Pro}/2 \times 10^5 \text{celule/ml}$		MMP			
Denumire		Doza		MMP9 (pixeli)		MMP2 (pixeli)	
			%de variație		%de variație		%de variație
Martor celular			0,0712		90,84		94,26
Martor solvent			0,0617		89,11		93,3
Extract <i>Herba Trifolii</i>	1/1000	0,1012	39,03	73,18	-21,8	94,61	1,4
	1/2000	0,0774	20,28	78,55	-13,4	94,32	1,1

# RO 128710 B1

Tabel (continuare)

Substanța		Colagen $\mu\text{g OH-Pro}/2 \times 10^5$ celule/ml		MMP			
				MMP9 (pixeli)		MMP2 (pixeli)	
Denumire	Doza		%de variație		%de variație		%de variație
Daidzeina	2,6 $\mu\text{M}$	0,0758	18,60	74,08	-20,3	90,61	-3,0
	1,3 $\mu\text{M}$	0,0761	18,92	73,83	-20,7	89,69	-4,0
Genisteina	3,4 $\mu\text{M}$	0,0325	-89,85	76,21	-16,9	91,95	-1,5
	1,7 $\mu\text{M}$	0,0287	-114,98	79,08	-12,7	92,98	-0,3
Biocianina	6,4 $\mu\text{M}$	0,0370	-66,76	81,52	-9,3	91,63	-1,8
	3,2 $\mu\text{M}$	0,0436	-41,51	72,71	-22,6	89,96	-3,7
Formononetin	32,7 $\mu\text{M}$	0,0583	-5,83	71,96	-23,8	95,95	2,8
	16,4 $\mu\text{M}$	0,0396	-55,81	77,11	-15,6	94,32	1,1
(Daidzeina + Genisteina + Biochanina + Formononetin) echivalent extract <i>Herba Trifolii</i>	1/1000	0,0786	21,50	92,95	4,1	96,71	3,5
	1/2000	0,0455	-35,60	91,04	2,1	95,86	2,7

## b) Stimularea ratei de multiplicare celulară

S-a testat efectul extractului de *Herba Trifolii* asupra statusului proliferativ celular prin 2 tehnici complementare de analiză: secvențialitatea ciclului celular și succesiunea generațiilor proliferative (citometrie în flux, marcarea cu iodură de propidiu și, respectiv, CFSE - carboxy fluorescein diacetat succinimidil ester). Rezultatele s-au estimat ca Indice de Proliferare, respectiv, suma procentelor de celule în fazele de multiplicare S și G2/M. Rezultatele demonstrează accelerarea ratei de multiplicare celulară indusă de extractul de *Herba Trifolii*, cu peste 30% față de martorul corespunzător. Accelerarea fazei S și intrarea în mitoză este puternic influențată, în special de formononetin și biochanina. Raportul în care se găsesc cele 4 componente este optim pentru stimularea proliferării celulare, acestea potențându-se reciproc.

Substanța testată	% faza S + G2/M	% de variație	Indice proliferare	% de variație
MARTOR	18,5		2,4	
Martor solvent	19,5		2,6	
extractului de <i>Herba Trifolii</i> 1/1000	28,9	48,2	3,5	34,6
extractului de <i>Herba Trifolii</i> 1/2000	25,3	29,9	3,0	16,9
Formononetin echivalent extractului de <i>Herba Trifolii</i> 1/1000	48,4	148,2	3,2	23,8
Biochanina echivalent extractului de <i>Herba Trifolii</i> 1/1000	47,2	142,1	3,9	48,8
Genisteina echivalent extractului de <i>Herba Trifolii</i> 1/1000	17,4	-10,7	3,3	27,3
Daidzeina echivalent extractului de <i>Herba Trifolii</i> 1/1000	27,8	42,6	3,5	33,8
(Daidzeina + Genisteina + Biochanina + Formononetin) echivalent extractului de <i>Herba Trifolii</i> 1/1000	56,1	187,7	5,4	106,5
(Daidzeina + Genisteina + Biochanina + Formononetin) echivalent extractului de <i>Herba Trifolii</i> 1/2000	54,0	176,9	5,1	95,4



# RO 128710 B1

c) Inducerea supraexpresiei integrinelor  $\alpha 1\beta 1$  și  $\alpha 2\beta 1$  (refacerea fermității structurilor dermo-epidermice) 1

Integrinele sunt proteine funcționale alcătuite din 2 subunități glicoproteice ( $\alpha$  și  $\beta$ ) care se extind de-a lungul membranei capabile să lege multipli liganzi, printre care și molecule din matrixul extracelular, având un rol important în adeziunea celulară, mișcarea și migrarea celulară. Integrina  $\alpha 1\beta 1$  mediază feed-back-ul de reglare a sintezei de colagen, realizând legături de tip celulă-colagen sau celulă-laminina 1 din matrixul extracelular, iar Integrina  $\alpha 2\beta 1$  mediază stimularea colagenazei de tip I (MMP1) cu rol în fibrilogeneza (organizarea colagenului în fibrile), leagă colagenul de tip I. Balanța între Integrina  $\alpha 1\beta 1$  și Integrina  $\alpha 2\beta 1$  este importantă pentru menținerea echilibrului între degradarea și sinteza de colagen, **Kähäri V.-M., Saarialho-Kere U., „Matrix metalloproteinases in skin”, Exp Dermatol 6: 199-213, 1997; Riikonen T., Westermarck J., Broberg A., Kahari V. M., Heino J., „Integrin alpha 2 beta 1 is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen alpha 1 (I) gene expression”, J. Biol. Chem., 270: 13548-13552, 1995; Zhang Z., Bothe I., Hirche F., Zweers M. C., Gullberg D., Pfitzer G., „Interactions of primary fibroblasts and keratinocytes with extracellular matrix proteins: contribution of alpha-2 beta-1 integrin”, J. Cell. Sci. 119: 1886-1895, 2006.** Tehnica de evidențiere a integrinelor prin citometrie în flux presupune utilizarea anticorpilor monoclonali pentru lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$  (CD49a, marcat fluorescent pentru PE, corespunzător subunității  $\alpha 2$ ; CD49b, marcat fluorescent pentru FITC, corespunzător subunității  $\alpha 1$ ; și CD29 marcat fluorescent pentru APC, corespunzător subunității  $\beta 1$ ). 3 5 7 9 11 13 15 17 19

Rezultatele prezentate în tabelul de mai jos, sub forma medianei canalelor de fluorescență corespunzătoare expresiei celor 3 lanțuri glico-proteice, au evidențiat acțiunea extractului selectiv de *Herba Trifolii*, în maniera doză-efect, asupra inducerii supraexpresiei lanțului glicoproteic  $\alpha 2$ , ceea ce indică o amplificare a legăturilor fibroblast - colagen de tip I și stimularea activității colagenazei cu rol în fibrilogeneză. S-a demonstrat faptul că această acțiune este dată în principal de biochanina și genisteina din componența extractului. Efectul determinat este similar cu cel al martorului pozitiv (TGF beta 4 ng/ml). 21 23 25 27

Substanța testată	FITC-A Mean(CD 49b - Integrina alfa 2)	% de variație	PE-A Mean (CD 49a -Integrina alfa 1)	%de variație	APC-A Mean (CD 29 - Integrina beta 1)	% de variație
MARTOR	14448		5837		4167	
PG	15122	4,67	6330	8,45	4984	19,61
TGF beta 4 ng/ml	44217	206,04	7005	20,01	8123	94,94
extract de <i>Herba Trifolii</i> 1/1000	29921	107,09	4851	-16,89	3719	-10,75
extract de <i>Herba Trifolii</i> 1/2000	25796	78,54	4092	-29,90	4314	3,53
Formononetin echivalent extract de <i>Herba Trifolii</i> 1/1000	14313	-0,93	3193	-45,30	2748	-34,05
Biochanina echivalent extract de <i>Herba Trifolii</i> 1/1000	24491	69,51	3220	-44,83	3594	-13,75
Genisteina echivalent extract de <i>Herba Trifolii</i> 1/1000	23269	61,05	3834	-34,32	4448	6,74
Daidzeina echivalent extract de <i>Herba Trifolii</i> 1/1000	18954	31,19	3797	-34,95	3597	-13,68

Tabel (continuare)

Substanța testată	FITC-A Mean(CD 49b - Integrina alfa 2)	% de variație	PE-A Mean (CD 49a -Integrina alfa 1)	%de variație	APC-A Mean (CD 29 - Integrina beta 1)	% de variație
(Daidzeina + Genisteina + Biochanina + Formononetin) echivalent extract de <i>Herba Trifolii</i> 1/1000	27371	89,44	6830	17,01	5308	27,38
(Daidzeina + Genisteina + Biochanina + Formononetin) echivalent extract de <i>Herba Trifolii</i> 1/2000	13679	-5,32	6726	15,23	5489	31,73

Rezultatele obținute prin testarea extractului de trifoi prin cele trei mecanisme ale reconstrucției țesutului dermic demonstrează rolul complementar al daidzeinei, genisteinei, formononetinului și biochaninei, precum și importanța combinației lor într-un anumit raport pentru maximizarea efectului.

*Demonstrarea activității antiinflamatoare la nivel de endoteliu vascular a extractelor din Folium Hedera helicis, Hippocastani semen, Radix Bardanae și Herba cyani*

Inflamația vasculară este caracterizată de adeziunea între limfocit și endoteliu declanșată de exprimarea unor molecule de adeziune - markeri de inflamație și secreția de citokine pro-inflamatorii: ICAM, caracteristic microvasculaturii și VCAM, specific vaselor mari de sânge, Fujimura T., Moriwaki S., Imokawa G., Takema Y., „**Crucial role of fibroblast integrins alpha 2 and beta 1 in maintaining the structural and mechanical properties of the skin**”, *J. Dermatol. Sci. Jan.*; **45(I): 45-53, 2007**. A fost determinat efectul antiinflamator la nivel vascular al preparatelor extract *Herba Cyani*, extract *Radix Bardanae*, extract *Hippocastani semen* și extract *Folium Hederæ Helicis*, comparativ cu un martor pozitiv de dexametazonă, în concentrație de 0,6 µg/ml, WenChieh CHEN, J. Yu-Yun LEE, Wen-Chuan HSIEH; „**Effects of dexamethasone and sex hormones on cytokine-induced cellular adhesion molecule expression in human endothelial cells**”, *European Journal of Dermatology.*, Vol. 12, Number 5, 445-8, September-October 2002. Simularea *in vitro* a inflamației s-a realizat cu LPS (polizaharid de origine bacteriană) și TNF $\alpha$  (stimul inflamator nespecific). S-a evaluat expresia proteică a VCAM-1 și ICAM-1 prin citometrie în flux, marcarea fluorescentă cu anticorpii corespunzători pentru ICAM-1, respectiv, VCAM-1, APC Mouse Anti-Human CD54 pentru evidențierea ICAM-1 (intracellular-adhesion molecule) și PE-Mouse Anti-uman CD106 pentru evidențierea VCAM-1 (vascular-cell-adhesion molecule). Rezultatele se analizează comparându-se media canalului de fluorescență APC, respectiv, PE pentru probele achiziționate. Rezultatele au fost comparate cu secreția citokinelor inflamatorii umane (IL6 și IL8), exprimate în pg/ml. Rezultatele sunt prezentate în tabelele de mai jos:

## RO 128710 B1

Substanța testată	celule nestimulate				celule stimulate LPS 1 ug/ml				celule stimulate TNF alfa 2 ng/ml				
	ICAM	% var.	VCAM	% var.	ICAM	% var.	VCAM	% var.	ICAM	% var.	VCAM	% var.	
Martor celular	10882,6		1366,9		13974,4		1287,0		15697,5		15697		1
Martor solvent (PG)	10436,0		1448,0		11789,0		1499,0		11053,0		1552,0		3
Extract <i>Folium Hederae Helicis</i> 10 µm	12443,3	14,3	1315,0	-3,8	12626,3	-9,6	1316,3	2,3	13275,0	-15,4	13995	-10,8	5
Extract <i>Folium Hederae Helicis</i> 15 µm	12101,1	11,2	1302,0	-4,8	12182,3	-12,8	1478,1	14,8	13241,2	-15,6	11993	-23,6	7
Extract <i>Folium Hederae Helicis</i> 20 µm	11941,2	9,7	1285,7	-5,9	12414,6	-11,2	1463,4	13,7	12036,7	-23,3	12019	-23,4	9
Escina 2 µm	12494,9	14,8	1249,3	-8,6	13453,7	-3,7	1246,1	-3,2	16041,7	2,2	14912	-5,0	11
Escina 1 µm	12784,2	17,5	1348,1	-1,4	12761,5	-8,7	1404,7	9,1	14093,3	-10,2	11570	-26,3	13
Escina 0,5 µm	13008,5	19,5	1315,0	-3,8	12787,8	-8,5	1303,3	1,3	12340,6	-21,4	13449	-14,3	15
Extract <i>Herba Cyani</i> 1/2000	11773,0	8,2	1480,0	8,3	10841,0	-22,4	1411,0	9,6	11058,0	-29,6	15260	-2,8	17
Extract <i>Herba Cyani</i> 1/3000	11207,0	3,0	1319,0	-3,5	11766,0	-15,8	1440,0	11,9	10422,0	-33,6	15200	-3,2	19
Extract <i>Radix Bardanae</i> 1/1000	9896,0	-9,1	1422,0	4,0	10378,0	-25,7	1306,0	1,5	10894,0	-30,6	18900	20,4	
Extract <i>Radix Bardanae</i> 1/2000	10244,0	-5,9	1456,0	6,5	10096,0	-27,8	1390,0	8,0	10439,0	-33,5	15410	-1,8	
Dexamethazona 0,6 ug/ml	10235,8	-5,9	1339,6	-2,0	11097,4	-20,6	1406,6	9,3	13095,0	-16,6	11310	-27,9	

## RO 128710 B1

	Substanța testată	celule nestimulate				celule stimulate LPS 1 ug/ml				celule stimulate TNF alfa 2 ng/ml			
		IL6 (pg/ml)	% var.	IL8 (pg/ml)	% var.	IL6 (pg/ml)	% var.	IL8 (pg/ml)	% var.	IL6 (pg/ml)	% var.	IL8 (pg/ml)	% var.
5	Martor celular	2054,5		2610,0		8166,1		4819,5		8543,4		5547,2	
	Factor solvent	2084,0		2497,5		7990,3		4626,7		8602,3		5024,3	
7	Extract <i>Folium Hederae Helicis</i> 10 μm	2543,6	23,8	2716,8	4,1	5295,6	-33,7	3273,8	-32,1	8037,9	-5,9	4971,6	-10,4
	Extract <i>Folium Hederae Helicis</i> 15 μm	2188,7	6,5	2328,9	-10,8	1961,2	-75,5	1206,2	-75,0	7346,8	-14,0	5026,6	-9,4
9	Extract <i>Folium Hederae Helicis</i> 20 μm	2109,3	2,7	2185,1	-16,3	4013,7	-49,8	2943,8	-38,9	6262,6	-26,7	4293,5	-22,6
	Extract <i>Hippocastani semen</i> 2 μm	1896,8	-7,7	2865,5	9,8	6922,8	-13,4	4483,1	-7,0	8900,7	4,2	5026,6	-9,4
11	Extract <i>Hippocastani semen</i> 1 μm	2194,8	6,8	2819,5	8,0	3550,0	-55,6	2284,9	-52,6	9113,3	6,7	5997,2	8,1
	Extract <i>Hippocastani semen</i> 0,5 μm	2212,8	7,7	2447,4	-6,2	5335,5	-33,2	3475,2	-27,9	6639,2	-22,3	4495,0	-19,0
13	Extract <i>Herba Cyani</i> 1/2000	1925,8	-6,3	2283,9	-12,5	5348,6	-33,1	2084,3	-56,7	6756,8	-20,9	2925,3	-47,3
	Extract <i>Herba Cyani</i> 1/3000	2195,6	6,9	2610,2	0,0	5558,2	-30,4	2353,6	-51,2	6314,1	-26,1	2608,8	-53,0
15	Extract <i>Radix Bardanae</i> 1/1000	2369,4	15,3	3011,1	15,4	5746,5	-28,1	2539,2	-47,3	6808,3	-20,3	2757,5	-50,3
	Extract <i>Radix Bardanae</i> 1/2000	2103,1	2,4	2699,4	3,4	5630,3	-29,5	2260,6	-53,1	6403,1	-25,1	2585,7	-53,4
17	Dexamethazona 0,6ug/ml	1823,7	-11,2	1542,8	-40,9	2215,0	-72,3	1100,2	-77,2	3218,5	-62,3	1379,9	-75,1

# RO 128710 B1

Rezultatele arată o acțiune diferențiată a extractului *Hippocastani semen* și *Folium Hederæ helicis*, precum și a extractului de *Radix Bardanæ* și extractului *Herba Cyani*, după cum urmează: extractul de *Hippocastani semen*, extractul de *Herba Cyani* și extractul de *Radix Bardanæ* au efect antiinflamator, în special la nivel de microvasculatură (inhibă expresia ICAM, molecula caracteristică vaselor mici de sânge și citokinele pro-inflamatorii IL6 și IL8), atât în condiții de inflamație de origine bacteriană, cât și în inflamațiile sistemice nespecifice; extractul de *Folium Hederæ helicis* acționează în special la nivelul vaselor sanguine mari (inhibă VCAM), doar în inflamația nespecifică. Aceste efecte susțin asocierea extractului *Hippocastani semen* și extractul de *Folium Hederæ helicis* pentru un efect antiinflamator generalizat la nivelul vasculaturii în cazul acțiunii anticelulitice, utilizarea extractului de *Folium Hederæ helicis* în produse de tip antiedematos (inflamație vasculară nespecifică pe vase sanguine mari), dar asociat cu extractul de *Radix Bardanæ* prin componenta sa antimicrobiană și răspuns antiinflamaor la stimuli bacterieni, pentru prevenția unor eventuale infecții locale. Asocierea dintre extractul de *Herba Cyani* și extractul de *Hippocastani semen* asigură un efect antiinflamator cumulat la nivel de microvasculatură dermică, inhibiția de către extractul de *Hippocastani semen* a citokinelor proinflamatorii IL6 și IL8 eliberate în condiții asociate unei infecții bacteriene fiind completată de acțiunea extractului de *Herba Cyani* manifestată și în cazul stimulilor proinflamatorii nespecifici.

*Demonstrarea capacității de reducere a permeabilității vasculare a extractelor din Folium Hederæ helicis și Hipocastani semen*

Acțiunea protectoare asupra vaselor sanguine se manifestă prin creșterea tonusului capilar produs de contracția mușchilor netezi ai vaselor de sânge, ceea ce duce la creșterea rezistenței și elasticității capilarelor și la scăderea permeabilității vasculare. Patologiile angiogenice sunt asociate cu apariția edemelor, mărindu-se permeabilitatea vasculară pentru apa și proteinele cu mase moleculare mari care pătrund astfel în spațiul extracelular. Unul din principalii modulatori ai acestui proces este factorul VEGF (vascular endothelial growth factor), cu dublu rol în angiogeneza și stimularea permeabilizării vasculare, a cărui inhibiție devine ținta terapeutică în diferite maladii vasculare. Materialele și metoda folosită sunt:

- Human VEGF Flex Set (BD CBA) și Human Soluble Protein Master Buffer Kit (BD CB A).

	VEGF pg/ml (Nestimulare)	% variație	VEGF pg/ml (stimulare TNF $\alpha$ )	% variație
Martor celular	39,3		71,4	81,4
DMSO	42,9		93,4	31,0
Extract <i>Hippocastani semen</i> 2 uM	64,9	51,2	69,2	-3,0
Extract <i>Hippocastani semen</i> 1 uM	46,2	7,5	80,1	12,2
Extract <i>Hippocastani semen</i> 0,5 uM	48,2	12,3	95,7	34,1
Extract <i>Folium Hederæ Helicis</i> 10 uM	44,1	2,8	84,5	18,4
Extract <i>Folium Hederæ Helicis</i> 15 uM	30,4	-29,1	62,8	-12,0
Extract <i>Folium Hederæ Helicis</i> 20 uM	19,3	-55,1	42,1	-40,9
Dexametazona 0,6 ug/ml	28,5	-27,5	48,2	-32,4

# RO 128710 B1

1 Rezultatele experimentale arată că, în condiții inflamatorii (stimulare cu  $TNF\alpha$ ), compo-  
nenta bioactivă din extractul *Hippocastani semen* nu acționează asupra factorului VEGF, în condiții  
3 bazale inducând chiar o activare a acestuia echivalentă cu permeabilizarea vaselor  
sanguine. Extractul de *Folium Hederae Helicis* scade chiar cu 40% concentrația factorului  
5 VEGF, acționând în sensul reducerii edemelor vasculare. Astfel, se recomandă includerea  
extractului de *Folium Hederae Helicis* în formulări de produse cu efect antiedematos și  
7 antiinflamator, completând spectrul de acțiune al extractului de *Hippocastani semen*.

## *Demonstrarea activității antimicrobiene a extractelor din Radix Bardanae și Herba Cyani*

9 Colonizarea microbiană reprezintă unul dintre evenimentele esențiale care stau la baza  
patogenezei multor afecțiuni dermatologice, de multe ori asociate și cu inflamația vasculară. În  
11 culturile microbiene dezvoltate în condiții de aerobioză din leziuni cutanate pustulare și  
nodulochistice, au fost izolate următoarele microorganisme: *Staphylococcus aureus* în 41% din  
13 cazuri, *S. epidermidis* în 53% și *Micrococcus spp.* în 45%, în timp ce, din culturile anaerobe,  
s-au izolat *S. aureus* în 39% din cazuri, *Propionibacterium acne* în 33% și *S. epidermidis* în  
15 21%, **Hassanzaadeh et al., 2007**. Pentru evidențierea efectului antimicrobian, s-au ales ca  
microorganisme model 36 de specii aparținând genului *Staphylococcus*, evaluându-se  
17 potențialul antipatogenic al extractelor din *Radix Bardanae* și *Herba Cyani*, conform următo-  
relor etape experimentale: izolarea în cultură pură a unor microorganisme din specimene clinice  
19 de tip leziuni cutanate, testarea calitativă a activității antimicrobiene, determinarea concentrației  
minime inhibitorii și evaluarea influenței asupra capacității de aderență la substrat inert.

21 La testarea calitativă prin metoda difuzimetrică, s-a evidențiat prezența unei inhibiții a  
creșterii microbiene la nivelul spotului de extract depus pe mediul de cultură însămânțat. S-a  
23 determinat concentrația minimă inhibitorie (CMI) pentru *Radix Bardanae* și *Herba Cyani*,  
raportată la conținutul în acizi polifenol carboxilici (APFC) și flavone din extractele analizate:

25 - Extract *Herba Cyani*: APFC: CMI = 1,562 mg/ml pentru *S. aureus*; CMI = 3,12 mg/ml  
pentru *S. epidermidis*. Flavone: CMI = 0,86 mg/ml pentru *S. aureus*; CMI = 1,715 mg/ml pentru  
27 *S. epidermidis*;

- Extract *Radix Bardanae*: APFC: CMI = 1,69 mg/ml pentru *S. aureus*; CMI = 0,84 mg/ml  
29 pentru *S. epidermidis*.

De asemenea, extractele de *Radix Bardanae* și *Herba Cyani* manifestă efect modulator  
31 pentru factorii de virulență produși majoritar de metabolismul secundar al microorganismelor  
studiate (*S. aureus* și *S. epidermidis*), dar și pentru hemolizine și lecitinază.

## *Demonstrarea activității fotoprotectoare față de radiația UV-A și UV-B a extractelor din Herba Trifolii, Hippocastani semen și Herba cyani*

35 Radiația UV reprezintă sursa principală de inflamație la nivel cutanat, astfel încât este  
necesară asocierea în produsele dermatocosmetice a unor fitocompuși ce intervin în  
37 contracararea efectelor nocive ale expunerii solare.

A fost testată acțiunea extractelor *Herba Trifolii*, *Hippocastani semen* și *Herba cyani* în  
39 patogeneza fotoîmbătrânirii prin screeningul următorilor parametri celulari:

- inducerea apoptozei declanșate de modificări la nivel de ADN;
- 41 - stress oxidativ celular - activarea intracelulară a speciilor de oxigen reactive;
- status inflamator: secreția citokinelor proinflamatorii (IL6, EL8), a IL1- $\alpha$  ca indicator de
- 43 sensibilizare și iritabilitate;
- secreția factorului VEGF (vascular endothelial growth factor) - promotor de
- 45 angiogeneză - etapa cheie în refacerea țesutului cutanat degradat și vindecare rănilor.

Centralizarea efectelor cumulative fotoprotectoare ale compușilor testați este prezentată  
47 în tabelele de mai jos (comparativ cu martorul pozitiv N-acetilcisteina 10 Mm):

# RO 128710 B1

Substanța testată/Efect biologic	Iradieră UV-A									
	Protecție față de apoptoză				Inhibiție IL 1a (pg/ml)	Inhibiție VEGF (pg/ml)	Inhibiție Citokine pro-inflamatorii		Inhibiție Stress oxidativ	
	% celule vii	% celule apoptotice timpurii	% celule apoptotice târzii	% celule necrotice			IL6 (pg/ml)	IL8 (pg/ml)	FITC-A (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )*	PE-A (O <sub>2</sub> )*
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
Extract <i>Herba Trifolii</i> 1/500	61,7	32,5	5,2	0,6	389,58	389,58	123,91	263,95	19609	15218
Extract <i>Herba Trifolii</i> 1/1000	50,4	40,9	8,2	0,5	371,92	371,92	143,76	521,73	28321	18723
Extract <i>Hippocastani semen</i> 1 μm	61,1	24,9	13,9	1	298,3	381,3	132,06	494,36	2544	17594
Extract <i>Hippocastani semen</i> 5 μm	63,0	24,8	12,1	0,1	264,2	345,9	165,22	559,26	15731	13826
Extract <i>Herba Cyani</i> 1/2000	49	45,1	5,6	0,4	335,28	335,28	265,3	588,9	24568	19877
Extract <i>Herba Cyani</i> 1/3000	46,1	44,6	8,8	0,5	384,05	384,05	270,3	570,2	28445	24336
N-Acetylcysteina	65,1	20,3	8,3	6,3	289,85	220,65	1058	1208	17896	16254

## RO 128710 B1

1

3

5

7

9

11

13

15

17

19

Substanța testată/Efect biologic	Iradieră UV-B									
	Protecție față de apoptoză				Inhibiție IL1a (pg/ml)	Inhibiție VEGF (pg/ml)	Inhibiție Citokine pro-inflamatorii		Inhibiție Stress oxidativ	
	% celule vii	% celule apoptotice timpurii	% celule apoptotice târzii	% celule necrotice			IL8 (pg /ml)	IL6 (pg/ ml)	FITC-A (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )*	PE-A (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )*
Martor celular	61,8	33	4,8	0,3	328,71	526,5	885,8	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
Extract <i>Herba Trifolii</i> 1/500	64,6	30,9	4,2	0,3	202,69	529,57	833,11	1725,04	23078	18823
Extract <i>Herba Trifolii</i> 1/1000	64,2	32,1	3,4	0,2	237,61	498,67	870,99	2241,54	27978	23417
Extract <i>Hippocastani semen</i> 1 μm	68,2	28,4	2,4	1	248,3	507,6	571,48	1468,39	23467	18753
Extract <i>Hippocastani semen</i> 5 μm	70,1	22,7	4,3	2,9	221,7	482,3	560,82	1583,99	28210	19944
Extract <i>Herba Cyani</i> 1/2000	71,8	24,6	3,5	0,1	203,89	152,23	822,1	2103,3	16537	8973
Extract <i>Herba Cyani</i> 1/3000	67,9	26,4	5,5	0,2	258,7	214,38	874,3	2244,2	20742	18544
N-Acetylcysteina	71,1	23,3	5,3	0,2	289,85	320	458	1208	18774	15443

\*Mediana canalului de fluorescență



# RO 128710 B1

Se constată un efect diferențiat al compușilor, fiecare acționând asupra altor căi de propagare a degradării celulare și inflamației induse de iradierea UV: 1

- extractul *Herba Trifolii* are efect de protecție celulară față de apoptoza indusă de radiația UV, de stopare a procesului inflamator declanșat prin semnalizarea citokinelor IL6 și IL8, antioxidant, în special față de UV-A. 3 5

- extractul de *Herba Cyani* este activ în special în cazul iradierii UV-B: antiapoptotic, antiiritativ prin inhibiția IL 1 $\alpha$  (citokina semnal pentru declanșarea alergiilor) și antiangiogenic prin inhibiția factorului VEGF. 7

- extractul de *Hippocastani semen* este protector celular față de apoptoză, antiinflamator și antiiritativ prin stoparea semnalizării IL6, IL8 și IL 1 $\alpha$ , atât în cazul UV-A, cât și UV-B, antioxidant în special față de UV-A. 9 11

Complementaritatea acestor efecte recomandă asocierea lor în produse dermatocosmetice de protejare a zonelor expuse. 13

În continuare, sunt descrise exemple de realizare a invenției:

## Exemplul 1 15

Obținerea extractului de *Herba Cyani* - 10 kg materie primă vegetală, recoltată imediat după înflorire, se usucă în pat subțire, la întuneric, în curent de aer cald, se macină și se introduce în instalația de extracție prin macerare dinamică, se extrage succesiv în trei trepte, cu alcool etilic 80%, timp de 2 h/treaptă în instalația de extracție rapidă, în raport plantă:solvent de extracție 1:20; la temperatura ambiantă, soluțiile obținute se supun decolorării cu cărbune activ în raport 0,5 g/100 ml soluție extrasă, apoi sunt analizate din punct de vedere al conținutului de substanțe active, se supun operațiilor de concentrare pentru recuperarea solventului în raport 1:10 și obținerea a 20 kg extract sub formă fluidă, în glicerină, standardizat în acizi polifenol carboxilici exprimați în acid cafeic de minimum 0,9 g/100 g și în compuși flavonoidici exprimați în rutin de minimum 0,5 g/100 g. 17 19 21 23 25

## Exemplul 2 27

Produs dermatocosmetic utilizabil în terapii alternative ale edemelor vasculare periferice, conținând ca substanțe biologice active extract de *Herba Trifolii* 5,00%, extract de *Folium Hederae Helicis* 2,00%, extract de *Radix Bardanae* 15,00%, și condiționat sub formă de gel. 29

### Formula de condiționare gel antiedematos 31

Nr.crt.	Denumire ingrediente	Formula cantitativă	
1	Apă	Ad. 100	33
2.	Glicerină	3,00	
3.	Extract <i>Folium Hederae Helicis</i>	2,00	35
4.	Extract <i>Herba Trifolii</i>	5,00	
5.	Extract <i>Radix Bardanae</i>	15,00	37
6	Extract de <i>Hippocastani Semen</i>	2,00	
7	Extract <i>Herba Cyani</i>	0,50	39
8	Dimetil izosorbid	1,00	
9	Diazolidinil Uree și Metilparaben și Propilparaben și Propilenglicol	0,80	41

# RO 128710 B1

1

Tabel (continuare)

3

5

7

Nr.crt.	Denumire ingrediente	Formula cantitativă
10	Carbomer	1,00
11	Hidroxid de sodiu soluție 18%	1,00
12	Pentilen glicol	5,00
13	Ulei de rozmarin	0,50
14	EDTA disodic	0,10

9

11

13

15

Procedeul de preparare a gelului antiedematos constă în amestecarea ingredientelor fazei 1 (apa, disodium EDTA, Extract *Folium Hederæ Helicis*, Extract de *Herba Trifolii*, Extract *Radix Bardanæ*, carbomer și soluție de hidroxid de sodiu) cu ingredientele fazei 2 (glicerina, pentilenglicol, ulei de rozmarin, dimetil isosorbide, propilen glicol, diazolidinil urea și metilparaben și propilparaben) sub agitare la temperatura cuprinsă între 25...30°C, timp de 15 min. Întregul proces se desfășoară sub vid la 350...400 mmHg. La sfârșitul procesului de omogenizare începe răcirea progresivă, până la o temperatură de aproximativ 25°C, sub agitare la 150 rpm.

# RO 128710 B1

## Revendicări

1. Produs fitoterapeutic dermatocosmetic cu acțiune cumulată în perturbări inflamatorii cutanate, **caracterizat prin aceea că** este constituit prin asocierea a 5,00...12,00% extract selectiv din *Herba Trifolii*, 0,10...0,70% extract selectiv din *Hippocastani semen*, 1,00...2,00% extract selectiv din *Folium Hederæ Helicis*, 0,10...2,50% extract selectiv din *Herba Cyani* și 1,00...5,00% extract selectiv din *Radix Bardanæ* asociate cafeinei, condiționate sub formă de cremă, ser sau gel. 3 5 7
2. Produs fitoterapeutic dermatocosmetic conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extractul selectiv izolat din *Folium Hederæ Helicis* este condiționat fie sub formă de extract fluid în glicerină, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat în acizi polifenol carboxilici exprimați în acid cafeic de minimum 0,3 g/100 g și în saponine triterpenice totale exprimate în hederacozida C de minimum 3 g/100 g, obținut în raport 1:1...1:2 (g/g) plantă:extract final, fie sub formă de extract uscat, pulbere alb-cafenie, nehigroscopică, standardizat în saponine triterpenice exprimate în hederacozida C de minimum 60%, obținut în raport 20:1 (g/g) plantă:extract final. 9 11 13 15
3. Produs fitoterapeutic dermatocosmetic conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extractul selectiv izolat din *Hippocastani semen* este condiționat fie sub formă de extract fluid, în glicerină, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat în proantociani de minimum 0,15 g/100 g și saponine triterpenice totale exprimate în escina de minimum 2 g/100 g, obținut în raport 1:1 (g/g) plantă:extract final, fie sub formă de extract uscat, pulbere galben-cafenie nehigroscopică, standardizat în saponine triterpenice exprimate în escina de minimum 70%, și în flavonoide de minimum 2% obținut în raport 33:1 (g/g) plantă:extract final. 17 19 21 23
4. Produs fitoterapeutic dermatocosmetic conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extractul selectiv izolat din *Radix Bardanæ* este condiționat sub formă de extract fluid în glicerină, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat în acizi polifenol carboxilici exprimați în acid cafeic de minimum 0,3 g/100 g, obținut în raport 1:1 (g/g) plantă:extract final. 25 27
5. Produs fitoterapeutic dermatocosmetic conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extractul selectiv izolat din *Herba Trifolii* este condiționat sub formă de extract fluid în glicerină, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat în compuși flavonoidici exprimați în quercetina de minimum 0,15 g/100 ml și în agliconii izoflavonici de minimum 0,23 g/100 ml ca sumă a daidzeinei, genisteinei, formononetinei și biochaninei A, și anume: daidzeina minimum 10 mg/100 ml, genisteina minimum 20 mg/100 ml, formononetina minimum 140 mg/100 ml și biochanina A minimum 60 mg/100 ml, obținut în raport 2:1...1:1 (g/g) plantă:extract final. 29 31 33
6. Produs fitoterapeutic dermatocosmetic conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extractul selectiv izolat din *Herba Cyani* este condiționat sub formă de extract fluid în glicerină, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat în acizi polifenol carboxilici exprimați în acid cafeic de minimum 0,9 g/100 g și în compuși flavonoidici exprimați în rutin de minimum 0,5 g/100 g, obținut în raport 1:1...1:2 (g/g) plantă:extract final. 35 37 39
7. Produs fitoterapeutic dermatocosmetic pe bază de principii active din plante, **caracterizat prin aceea că** este destinat utilizării în terapia antiinflamatoare cutanată, asociată edemelor vasculare periferice, hiperchromiei periorbitale, și în afecțiuni de tip lipodistrofic. 41
8. Procedeu de preparare a unui produs fitoterapeutic dermatocosmetic pe bază de principii active din plante definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** materiile prime vegetale uscate și mărunțite se supun unei operații de extracție primară, la temperatura 43 45

# RO 128710 B1

1 camerei, timp de 6...48 h, prin macerare dinamică, cu alcool etilic de concentrație 40...96%,  
3 soluțiile extractive obținute se supun prelucrării prin operații de decolorare cu cărbune activ în  
5 proporție de 0,1...1 g/100 ml soluție extrasă, concentrare sub vid și condiționare în glicerină,  
7 propilenglicol sau butilenglicol, obținându-se extractele selective fluide sau după etapa de  
9 concentrare sub vid, produsul obținut se supune unei separări selective cu n-butanol sau acetat  
11 de etil, în raport de 1:3...1:10, extractele organice se concentrează sub vid până la reziduu  
uscat în curent de aer cald la 50...60°C cu obținerea unor extracte uscate, urmată de asocierea  
a 5,00...12,00% extract selectiv din *Herba Trifolii*, 0,10...0,70% extract selectiv din *Hippocastani  
semen*, 1,00...2,00% extract selectiv din *Folium Hederae Helicis*, 0,10...2,50% extract selectiv  
din *Herba Cyani* și 1,00...5,00% extract selectiv din *Radix Bardanae* asociate cafeinei, și  
condiționate sub formă de cremă, ser sau gel.



**Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM**  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 326/2017