



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **28/09/2012**

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

(41) Data publicării cererii:
30/09/2013 BOPI nr. **9/2013**

(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;**

• **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,
SAT BRĂNEȘTI, IF, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**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%202012, RO 127000 A2>**

(54) **PRODUS DERMATOCOSMETIC ÎMPOTRIVA ÎMBĂTRÂNIRII,
CU EFECT REGENERATOR, RESTITUTIV, MODULATOR
ESTROGENIC ȘI FOTOPROTECTOR**



1 Prezenta invenție se referă la produse fitoterapice cu acțiuni complementare: estrogen-
2 mimetică, de accelerare a turn-overului celular și proteic, de remodelare a cicatrizării imperfecte,
3 antioxidantă, antiinflamatoare față de radiația UV, asociate în prevenirea și tratamentul
4 îmbătrânirii și al proceselor conexe de degradare a țesutului cutanat, condiționate sub formă
5 de produse dermatocosmetice.

6 În cadrul procesului de îmbătrânire, au loc o serie de evenimente celulare și moleculare
7 complexe și diferențiate în funcție de agresiunea mediului extern (foto-îmbătrânire), dar și de
8 specificitatea intrinsecă a organismului respectiv (îmbătrânirea cronologică). Proliferarea
9 celulară și corelarea acesteia cu diverse căi metabolice (Calciu intracelular, protein kinaza C)
10 reprezintă un parametru relevant pentru studii de tip „anti-aging” la nivelul pielii [Y. Soroka et
11 al. /**Experimental Gerontology 43 (2008) 947-957**], fiind cunoscută scăderea ratei de
12 multiplicare și a turn-overului celular ale fibroblastului, asociate cu îmbătrânirea.

13 Derma este alcătuită, în mare parte, din fibre de colagen și elastină. Fibrele groase de
14 colagen susțin pielea. Fibrele de elastină sunt foarte flexibile și conferă pielii rezistență meca-
15 nică și adaptabilitate la modificările conformaționale. În tinerețe predomină sinteza colagenului,
16 ca, după 40 de ani, să domine degradarea acestuia. Prin urmare, pentru a menține un echilibru
17 între sinteză și degradare, după o anumită vârstă, trebuie stimulată sinteza colagenului și
18 inhibată degradarea lui [J. Biol. Chem., Vol. 274, Issue 51, 36083-36088, dec. 17, 1999].

19 Considerând ca dominant în piele colagenul de tip I și III, se folosesc agenți și trata-
20 mente pentru a stimula sinteza acestor tipuri de colagen. De asemenea, se poate inhiba degra-
21 darea colagenului ca metodă unică sau în conjuncție cu stimularea sintezei. Multe cercetări s-au
22 axat pe găsirea unor inhibitori topici eficienți ai metaloproteinazelor (în particular: colagenaza),
23 în timp ce modulatori la nivel molecular și genic (de exemplu, activarea/inhibiția expresiei TGF-
24 beta) reprezintă ținta cea mai recentă a formulărilor inovatoare de dermatocosmetice anti-aging.
25 Un alt aspect important este cicatrizarea defectuoasă după expunere solară sau traume minore,
26 datorată depozitelor de colagen și elastină formate din fibre dezorganizate. Intervenția
27 terapeutică în acest caz trebuie să aibă loc pe două căi: degradare enzimatică a acestor aglo-
28 merări fibrilare, sub acțiunea metaloproteinazelor activate, și stimularea sintezei proteice pentru
29 regenerarea suportului structural din matrixul extracelular. Pe lângă acest proces, recent a fost
30 descoperit un mecanism convergent la nivelul integrinelor $\alpha 1\beta 1$ și $\alpha 2\beta 1$, cu rol în realizarea
31 legăturilor celulă-matrice proteică extracelulară, amplificarea expresiei acestora la nivel de
32 fibroblast dermic susținând restabilirea fermității pielii.

33 Foto-îmbătrânirea, cauzată de acțiunea radiațiilor UV generatoare de radicali liberi la
34 nivel celular, are caracteristici fiziologice distincte față de îmbătrânirea cronologică. Stresul foto-
35 oxidativ, originar din speciile de oxigen reactive, formate în pielea expusă la soare, reprezintă
36 un mecanism patologic cheie, având consecințe atât la nivelul degradării matricei extracelulare
37 și formării ridurilor, cât și în foto-mutageneza celulară implicată în carcinogeneza pielii
38 [M. Carini et al.: **Il Farmaco 55 (2000) 526-534**]. Având în vedere cele prezentate, una dintre
39 acțiunile țintă ale unui ingredient dermatocosmetic ar trebui să fie cea de reducere a stresului
40 oxidativ celular și a reacțiilor în lanț declanșate de acesta: inducerea apoptozei, a secreției
41 citokinelor pro-inflamatorii, vascularizare aberantă, promovată la nivel molecular de factorul
42 VEGF [GT Wondrak, **Mechanisms and potential for therapeutics in skin photodamage -**
43 **Curr Opin in Invest Drugs vol. 8, 390-400 (2007)**]. Un alt aspect important în cadrul
44 fenomenului de îmbătrânire îl constituie depleția hormonală fiziologică (post-menopauză) sau
45 în asociere cu patologii conexe. O nouă tendință a produselor de tip anti-aging este aceea de
46 a acționa „estrogen-like”, având în vedere efectele fiziologice ale hormonilor sexuali (în special
47 estrogenul) asupra pielii: stimularea sintezei și turn-overul colagenului, creșterea producției de
48 acid hialuronic, creșterea ratei mitotice a epidermei etc.

RO 128802 B1

- Astfel, ținta biologică a ingredientelor dermatocosmetice de tip anti-aging este multiplă, 1
pentru o acțiune completă fiind necesară acțiunea convergentă a mai multor principii active.
- Din analiza datelor furnizate de literatura de specialitate au fost identificate și analizate 3
o serie de brevete de invenție care tratează rezolvarea problemelor majore ale îmbătrânirii
tenului, utilizându-se principii active izolate, din plante ca atare sau în amestec, fie exclusiv sau 5
împreună cu substanțe cosmetic active de sinteză.
- Unul dintre principiile active care fac obiectul specialiștilor din domeniul cosmetic îl 7
constituie acizii triterpenici, în principal acidul ursolic, component principal al extractului
triterpenic uscat din *Salvia officinalis folium*. 9
- Se cunosc, din articolul “**Therapeutic strategies for innovative anti-aging 11
cosmeceuticals, based on fully exploitation o three species of Romanian medicinal 11
plants**”, B. Dumitriu, L. Olariu, L. Zglimbea, extracte pe bază de plante *Callendula Officinalis*
și, respectiv, *Trifolium Partense herba*, denumite Dermo Oz, Dermo O și Dermo ET, cu acțiune 13
de restructurare a organizării fibrilare pentru vindecarea leziunilor superficiale și, respectiv, cu
efect estrogen-like. 15
- Din cererea de brevet de invenție **RO 127000 A2**, se cunoaște un complex bioactiv cu 17
acizi triterpenici, utilizat drept componentă bioactivă farmacologică, în terapia umană sau 17
veterinară, precum și un procedeu pentru obținerea acestuia. Complexul conform invenției este
pe bază de *Salvia species herba*, prezentând structură cristalină, solubilitate îmbunătățită și un 19
conținut de 100% acizi, format din minimum 80% acid ursolic și maximum 20% amestec
constituit din unul sau mai mulți dintre acizii: oleanoic, hidroxiursolic, hidroxioleanoic, betulinic 21
și dehidrobetulinic, în stare liberă sau ca săruri de Na, K sau NH₄.
- În brevetul de invenție **KR 20100060753** este revendicată o compoziție cosmetică pe 23
baza unui extract din rădăcină de *Pfaffia glomerata*, care prezintă un efect protector față de
deteriorarea sub influența factorilor toxici și a stresului exterior, cu adaos de până la 10% acid 25
ursolic, oleanolic, beta-caroten sau retinol.
- Jung Chang Jo ș.a. revendică, în brevetul de invenție **KR 20090038285**, o compoziție 27
cosmetică obținută pe baza unui extract de *Prunella vulgaris* și frunza de *Aloe Barbadensis* ca
principii active. Se menționează că extractul de *Prunella vulgaris* conține acid oleanolic și ursolic 29
cu eficacitate demonstrată în hidratarea pielii.
- Brevetul de invenție **FR 2885804** prezintă o compoziție cosmetică având efect de 31
prevenire/întârziere a procesului de deteriorare cutanată, datorită foto-îmbătrânirii, ce are în
compoziție agenți antiinflamatori naturali, respectiv, acid ursolic, ca inhibitor al elastazei 33
leucocitare umane, alături de vitamina K, derivați ai vitaminei A și pseudopeptide. Testele de
eficacitate *in vitro* au fost realizate prin incubarea unui eșantion de elastază din neutrofile 35
umane, timp de 10 min, cu un strat cromogen; valoarea inhibiției a fost de 81...86%, în funcție
de concentrația acidului ursolic (0,004...0,01%). 37
- Produsul de îngrijire a pielii îmbătrânite, ce face obiectul brevetului **EP 1566170**, are în 39
compoziție acid ursolic și/sau sărurile acestuia, și un extract de Ginkgo biloba. Efectele se
preconizează a fi cele cunoscute în literatură, de stimulare a microcirculației pentru extractul de
Ginkgo, determinând creșterea penetrabilității acidului ursolic la nivelul pielii, pentru a stimula 41
sinteza colagenului.
- În scopul reducerii ridurilor și al îmbunătățirii texturii dermice, Cho Bylong Gi și col. 43
revendică, în brevetul de invenție **KR 20010094550**, o compoziție cosmetică ce conține, ca
principii cosmetic active, pe lângă acidul ursolic, și palmitoilpentapeptida sintetică, având rol în 45
maximizarea îmbunătățirii calității pielii.

RO 128802 B1

1 În cererile de brevet de invenție **DE 102005026357** și **DE 102004050563** sunt revendi-
cate compoziții cosmetice de uz topic, pentru tratarea îmbătrânirii pielii și a dereglărilor de
3 pigmentare, realizate dintr-o combinație de principii active (acid ursolic, acid oleanolic, betaine
naturale, flavonoide și isoflavonoide, derivați xantینici naturali, extracte de grâu și ovăz, extract
5 din vin roșu, semințe de strugure și ceai negru), ce stimulează sinteza colagenului și asigură
creșterea/îmbunătățirea interacțiunii între matricea extracelulară și fibroblaste.

7 Brevetul **KR 20000045576** propune o compoziție cosmetică pe bază de extract de
Crategus fructus, utilizată pentru prevenirea sau întârzierea îmbătrânirii pielii prin înlăturarea
9 radicalilor liberi, condiționată ca loțiune, cremă pentru masaj și cremă nutritivă, unul dintre
principiile active semnalate fiind acidul ursolic.

11 Acțiunea sinergică a acizilor ursolic și oleanolic, alături de retinol, de inhibare a
diferențierii keratinocitelor, este prezentată în brevetul de invenție **RU 2175546**.

13 Kitada Yoshiro ș.a. revendică în brevetul de invenție **JP 11012122** un produs cosmetic
destinat prevenirii sau reducerii efectelor îmbătrânirii asupra pielii, în special a efectelor foto-
15 îmbătrânirii, prin intermediul unui amestec de ingrediente cosmetic active, cu acțiune sinergică
de împachetare a fibrelor de colagen dermic, și cu acțiune antiinflamatoare, ca, de exemplu,
17 acid ursolic obținut din plante din familia *Rosaceae*, *Rhamnaceae* sau *Caprifoliaceae*, alături de
extract de *Sanguisorba off*, *Artemisia capillaris*, *Fagara mantschurica* sau acid salicilic.

19 Kang și colaboratorii revendică, în **US 2010119628**, o compoziție cosmetică anti-aging
ce conține extract de *Hibiscus esculentum* și cel puțin unul dintre acizii triterpenici: ursolic,
21 oleanolic, glicirinetic și retinol. Efectul urmărit a fost de îmbunătățire a aspectului ridurilor prin
promovarea sintezei colagenului. Testarea *in vitro* de promovare a sintezei colagenului fibro-
23 blastelor s-a realizat doar cu extractul de *Hibiscus*. Testele clinice, cu variante de compoziții
cosmetice care includeau și acizii triterpenici și retinolul, realizate pe grupuri de femei cu vârsta
25 de 30...39 ani, au evidențiat îmbunătățirea efectelor în cazul variantelor ce conțineau acid
ursolic și/sau oleanolic.

27 Acțiunea cosmetic activă a extractelor din *Viola tricolor*, utilizate ca atare sau în amestec
cu alte principii active naturale, este, de asemenea, studiată în literatura de specialitate.

29 Astfel, în brevetul de invenție **KR 20110023437** este prezentată o compoziție cosmetică
ce conține, pe lângă extractul de *Viola tricolor*, și extracte din *Bellis Perennis*, *Calendula*
31 *officinalis*, *Carthamus tinctoris* și *Geranium maculatum*, iar acțiunea declarată a acestui amestec
este antioxidantă și de creștere a elasticității pielii.

33 Produsul cosmetic ce face obiectul revendicărilor brevetului de invenție **JP 2008037812**,
cu efect declarat anti-îmbătrânire, prin conferirea de elasticitate și fermitate pielii, are, ca și
35 constituenți, extracte naturale, obținute din materii prime selecționate dintre *Trifolium partense*,
Salvia officinalis, *Camelia sinensis*, *Bellis perennis*, *Viola tricolor*, *Papaver Rhocas*, *Crategus*
37 *oxycantha*, *Hippophae Rhamnoides* etc.

Brevetul de invenție **KR 960016197** revendică un agent natural de captare a radiațiilor
39 UV, ce constă dintr-un amestec de extract de cafea și un extract de *Viola tricolor* al cărui
component principal este un compus fenolic.

41 Brevetul **JP 2000159622** propune un preparat de uz extern, cu efect excelent de albire,
având o bună supresiune a melaninei, ce conține un extract uscat, obținut din *Viola tricolor*.

43 De asemenea, în brevetul de invenție **IL106288**, este revendicată o compoziție cosme-
tică având acțiune de regenerare a pielii, pe bază de extracte de *Viola tricolor* și *Stelaria media*.

45 Extractul pe bază de *Viola tricolor* ca atare face obiectul mai multor brevete de invenție,
dintre care specificăm **KR 100858449**, **KR 20070121338** și **JP 5255060**, fiind menționate
47 acțiunile sale de promovare a sintezei enzimelor și receptorilor asociați cu acidul hialuronic,
acțiunea de umidificare dermică, prin inhibarea evaporării la nivel tegumentar, acțiune antiinfla-
49 matoare și de îmbunătățire a circulației la nivelul dermei.

RO 128802 B1

- O altă materie primă vegetală pentru obținerea unor principii cosmetice active, utilizate în produse anti-îmbătrânire, o constituie *Medicago sativa*. 1
- Tsuji Keiko ș.a. revendică, în brevetul de invenție **JP 2009221173**, un ameliorator al statusului cheratinei, pe bază de extract apos de *Medicago sativa*, utilizat în produse cosmetice, în scopul îmbunătățirii nivelului de apă legată al cheratinei, având potențial iritogen redus. 3 5
- Produsul cosmetic ce face obiectul brevetului de invenție **JP 2008247786** are ca ingredient activ un amestec de extracte din *Medicago sativa* și soiurile albe și roșii de *Canavalia gradiata*, cu acțiune declarată de ameliorare a agregării cheratinei din *stratum corneum*, ceea ce determină proprietăți excelente de menținere a apei în țesutul pielii, alături de catifelarea acesteia, de creștere a gradului de transparență și a stimulării pielii. 7 9
- De asemenea, în brevetul de invenție **FR 2921836** se prezintă utilizarea ingredientelor cosmetice active, pe bază de *Medicago sativa* împreună cu extractul de *Lupus albinus*, în vederea preparării unui produs cosmetic/dermofarmaceutic cu acțiune de inhibare a enzimei de conversie a angiotensinei în proporție de 77%. 11 13
- În brevetul de invenție **JP 2008247787** este prezentat un extract apos pe bază de *Medicago sativa*, cu efect de creștere a turn-overului stratului *corneum*, ceea ce permite o rapidă îndepărtare a stratului *corneum* îmbătrânit, prin îndepărtarea melaninei din acesta, ducând astfel la ameliorarea petelor pielii, și crescând gradul de transparență al acesteia, având, de asemenea, și un efect stimulator, proprietăți care îl recomandă pentru utilizări în produse cosmetice topice. 15 17 19
- Brevetul european **EP 1559417** revendică un ingredient activ cu efect anticearcăn și proprietăți de catifelare, recomandat pentru utilizarea în scopul combaterii efectelor îmbătrânirii pielii, obținut din pulbere de semințe de *Medicago sativa*, prin dizolvarea acesteia în mediu apos. 21 23
- Brevetul de invenție **WO 9956712**, în care este descris un proces de preparare a unui produs cosmetic și/sau farmaceutic cu acțiune de stimulare a metabolismului cutanat, menționează, în acest sens, obținerea unui extract din semințe germinate de *Medicago sativa*, care poate fi utilizat în amestec cu alți aditivi în proporție de 0,01%, în produse cosmetice anti-îmbătrânire. 25 27 29
- Brevetul de invenție **US 5770223** prezintă utilizarea saponinelor extrase din frunze sau din rădăcini de *Medicago sativa*, pentru prepararea de produse farmaceutice și/sau cosmetice, în scopul combaterii efectelor de îmbătrânire a pielii, prin încetinirea proceselor de diferențiere celulară a epidermei, în special a cheratinocitelor. 31 33
- Din analiza brevetelor de invenție care se referă la compoziții cosmetice cu acțiune anti-aging, care au în compoziție extracte pe bază de *Trifolium repens*, se menționează brevetul **KR 20110090803**, în care este prezentată o compoziție cosmetică ce utilizează un extract din *Trifolium repens* sau sucul din această plantă, alături de alte extracte vegetale nementionate, în scopul reducerii ridurilor și al întârzierii instalării semnelor de îmbătrânire a feței. 35 37
- În brevetul de invenție **JP 2009001515** este prezentat un compus pe bază de isoflavone, cu acțiune de reglare estrogenică, utilizabil în produse cosmetice, obținut din flori, frunze sau semințe de *Trifolium repens*. mărunțite împreună cu fructe de *Ficus carica*. 39 41
- În brevetul de invenție **JP 2006241036** este revendicat un produs cosmetic anti-aging, cu efect declarat sinergie antirid, care conferă fermitate și elasticitate pielii îmbătrânite. Ingredientele cosmetice active descrise sunt extractul de *Chlorella vulgaris*, promotor al sintezei de colagen, un agent estrogenic selectat din următoarele extracte: *Pueraria Radix*, *Pueraria mirifica*, *Trifolium pratense*, un compus neutralizant al substanțelor oxigen active (*Sanguisorba off.*, *Moutan Cortex*, *Olea europea* frunze) și un agent antiinflamator pe bază de *Houttuynia cordata*, *Althea* și *Aloe Vera*. 43 45 47

RO 128802 B1

1 Brevetul de invenție **WO 002087533** prezintă utilizarea unui extract pe bază de *Trifolium*
în produse cosmetice/dermatologice pentru tratamentul și profilaxia tulburărilor degenerative
3 ale pielii.

De asemenea, în brevetul de invenție **WO 9918927** este revendicat un produs de uz
5 cosmetic și dermofarmaceutic având ca ingredient activ un extract din *Trifolium* - fiind mențio-
nate ca surse de materii prime varietățile *Trifolium subterraneum*, *repens*. Extractul imită efectul
7 unor hormoni steroizi, fiind recomandat a fi administrat în situații de premenopauză, în scopul
îmbunătățirii hidratării, îmbunătățirii tonusului pielii, al obținerii unui aspect catifelat al acesteia.

9 Extractele pe bază de *Calendula officinalis* (gălbenele) sunt, de asemenea, utilizate
adesea în produse cosmetice.

11 În acest sens, menționăm brevetul de invenție **RU 2008127894**, în care se revendică
un produs cosmetic pentru tratarea modificărilor pielii ca urmare a îmbătrânirii, obținut pe baza
13 unui amestec de principii active naturale, precum extractele de gălbenele, lavandă, salvie,
pătrunjel, în părți egale.

15 Brevetul de invenție **RO 123162** se referă la compoziții pe bază de plante cu acțiune
antirid, având în compoziție *Calendula officinalis*, alături de *Urtica dioica*, *Rosmarinus officinalis*,
17 *Glycyrrhiza glabra* și *Robinia pseudoaccacia*.

Brevetul de invenție **RO 118256** prezintă o cremă cosmetică antirid ce conține, ca ingre-
19 diente active, ulei de gălbenele, alături de extracte de Ginseng, orez, ulei de avocado, ulei din
germeni de grâu. Acțiunea declarată a produsului cosmetic asupra epidermei este regenerativă
21 și hidratantă.

În brevetul de invenție **RO 120314**, Visan T. și colab. se referă la o compoziție cosmetică
23 pe bază de principii active vegetale, pentru prevenirea și atenuarea ridurilor datorate
îmbătrânirii, în care utilizează extractul de gălbenele alături de extractul de *Hypericum*
25 *perforatum*, vitamina A și pantotenat de calciu.

Din analiza datelor bibliografice legate de utilizarea extractelor pe bază de *Salvia*
27 *officinalis*, *Calendula officinalis*, *Trifolium pratense*, *Viola tricolor* și *Medicago sativa* în com-
poziții cosmetice cu acțiune anti-aging, rezultă următoarele dezavantaje:

29 - în brevetele prezentate, produsele obținute nu sunt standardizate în componentele
active, și nu sunt prezentate date legate de compoziția chimică, sau randamentele de obținere
31 ale acestora;

- extractele utilizate ca ingrediente cosmetic active sunt utilizate în compoziții cosmetice
33 anti-îmbătrânire fie singular, fie în combinații, iar paleta de acțiuni cosmetice acoperită este mult
mai mică, fiind de obicei unilaterală, astfel:

35 - pentru extractul din *Salvia officinalis folium*: **KR 20100060753** - protector față
de deteriorarea sub influența factorilor toxici și a stresului exterior; **KR 20090038285** -
37 hidratarea pielii; **FR 2885804** - inhibitor al elastazei leucocitare umane; **US 2010119628**, **EP**
1566170 - stimularea sintezei colagenului, efect antirid, catifelare și umectare; **KR 20010094550**
39 - reducerea ridurilor și îmbunătățirea texturii dermice; **DE 102005026357** și **DE 102004050563** -
stimularea sintezei colagenului și îmbunătățirea interacțiunii între matricea extracelulară și
41 fibroblaste; **KR 20000045576** - prevenirea sau întârzierea îmbătrânirii pielii prin înlăturarea
radicalilor liberi; **RU 2175546** - inhibarea diferențierii keratinocitelor; **JP 11012122** - acțiune
43 sinergică de împachetare a fibrelor de collagen dermic și antiinflamatoare;

- pentru extractul din *Viola tricolor* ce acționează în amestec cu alte extracte:
45 **KR 20110023437** - antioxidantă și de creștere a elasticității pielii; **JP 2008037812** - anti-
îmbătrânire prin elasticitate și fermitatea pielii; **KR 960016197** - captarea radiațiilor UV;
47 **JP 2000159622** - efect de albire; **IL 106288** - regenerarea pielii; **KR 100858449**
KR 20070121338 și **JP 5255060** - sinteza enzimelor și receptorilor asociați cu acidul hialuronic,
49 acțiunea de umidificare, antiinflamatoare, îmbunătățirea circulației;

RO 128802 B1

- pentru extractul de *Medicago sativa*: **US 5770223**, **JP 2009221173** - ameliorator al statusului cheratinei; **JP 2008247786** - ameliorare a agregării cheratinei; **FR 2921836** - inhibarea enzimei de conversie a angiotensinei; **JP 2008247787** - creșterea turn-overului stratului corneum, îndepărtarea melaninei și ameliorarea petelor pielii; **EP 1559417** - efect anti-cearcăn și proprietăți de catifelare; **WO 9956712** - stimulare a metabolismului cutanat;

- pentru extractul de *Trifolium pratense* ce acționează singur sau în amestec cu alte extracte: **JP 2006241036**, **KR 20110090803** - anti-aging; **WO 9918927**, **JP 2009001515** - reglare estrogenică, îmbunătățind hidratarea și tonusul pielii; **WO 002087533** - tratamentul și profilaxia tulburărilor degenerative ale pielii;

- extractele pe bază de *Calendula officinalis* în amestec cu alte extracte: **RU 2008127894** - tratarea modificărilor pielii ca urmare a îmbătrânirii; **RO 118256**, **RO 123162** - antirid, regenerativă și hidratant; **RO 120314** - regenerativă la nivelul celulelor cutanate, determinând o creștere a troficității pielii;

- marea majoritate a acțiunilor menționate pentru extractele prezentate nu sunt susținute de testări complete *in vitro* și *in vivo* ale efectelor anti-îmbătrânire declarate, cu mici excepții: **FR2885804**, **US 2010119628**.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este realizarea unor game cosmetice care conțin extracte standardizate, asociate pentru acțiunile biologice complementare: de refacere a structurilor epidermice și dermice, cu activitate estrogen-mimetică și protecție celulară față de radiația UV.

Soluția propusă pentru rezolvarea problemei tehnice constă în obținerea unor produse cosmetice pe bază de extracte obținute din diferite specii de plante.

Astfel, invenția se referă, într-un prim aspect, la un produs dermatocosmetic împotriva îmbătrânirii, cu efect regenerativ, restitativ, modulator estrogenic, fotoprotector, care constă din asocierea a 2...6 extracte vegetale în proporții de 0,01...2% extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, 0,1...3% extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, 0,02...3% extract triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, 0,5...5% extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, 0,01...5% extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, 0,3...6% extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, condiționat sub formă de cremă, gel sau loțiune.

Într-un alt aspect, invenția se referă la un produs dermatocosmetic definit mai sus, ce are în compoziție 0,01... 0,5% extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, 0,5...1,5% extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, și 1...5% extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale, condiționat sub formă de cremă dermo-restitativă de zi.

Într-un alt aspect, invenția se referă la un produs dermatocosmetic definit mai sus, ce are în compoziție 0,01...0,5% extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, 0,5...1,5% extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și 1...5% extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale, condiționat sub formă de cremă dermorestitativă de noapte.

Într-un alt aspect, invenția se referă la un produs dermatocosmetic definit mai sus, ce are în compoziție 0,5...5% extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, 0,05...1,5% extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și 0,5...5% extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale, condiționat sub formă de gel sau loțiune de îngrijire a tenului după ras.

Într-un alt aspect, invenția se referă la un produs dermatocosmetic definit mai sus, ce are în compoziție 0,02...2% extract triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, și 1...6% extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale, condiționat sub formă de loțiune pentru protecție solară.

RO 128802 B1

1 Într-un alt aspect, invenția se referă la un produs dermatocosmetic definit mai sus, ce
are în compoziție 0,5...3% extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, 0,05...1,5%
3 extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și 0,3...1% extract
flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale, condiționat sub
5 formă de cremă anti-aging, recomandat persoanelor peste 45 de ani.

7 Într-un alt aspect, invenția se referă la un produs dermatocosmetic definit mai sus, ce
are în compoziție 0,1...3% extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*,
0,5...4% extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, și 0,1...3% extract triterpenic
9 hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale, condi-
ționat sub formă de cremă de mâini cu efect reparator.

11 Într-un alt aspect, invenția se referă la un produs dermatocosmetic definit mai sus, ce
are în compoziție 1...5% extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, 0,1...1%
13 extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și 0,01...3% extract
triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, alături de extracte de *Arctium lappa*, *Corylus*
15 *avellana* și *Centaurea cyanus*, și de ingrediente cosmetice uzuale, condiționat sub formă de
cremă și loțiune antiacneică.

17 Într-un alt aspect, invenția se referă la un produs dermatocosmetic definit mai sus, ce
are în compoziție 1...4% extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, 0,05...2%
19 extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, 0,1...1% extract uscat de saponine triter-
penice, din *Calendula officinalis herba*, 0,3...1% extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*,
21 și 1...5% extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, alături de ingrediente cosmetice
uzuale, condiționat sub formă de cremă de remodelare cutanată post-traumatică.

23 De asemenea, invenția se referă la un produs dermatocosmetic definit mai sus, utilizat
pentru prevenirea și terapia anti-îmbătrânire, fotoprotectoare.

25 Invenția se mai referă la un produs dermatocosmetic definit mai sus, utilizat în procesele
de regenerare epidermală și remodelare dermică.

27 De asemenea, invenția se referă la un produs dermatocosmetic definit mai sus, utilizat
în prevenirea cicatricelor inestetice și favorizarea vindecării rănilor minore de diferite etiologii:
29 arsuri solare, mici traumatisme, leziuni cutanate etc.

31 Gama de preparate obținute pe baza produsului dermatocosmetic conform invenției
cuprinde următoarele:

33 - *Cremă dermorestitutivă de zi*, bazată pe asocierea dintre extractul triterpenic uscat, din
Salvia officinalis folium, extractul flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, și extractul triterpenic
fluid, din *Medicago sativa herba*, care, prin cumularea acțiunilor principiilor active la nivel de
35 celulă țintă, conferă produsului proprietăți dermo-restitutive, de refacere a fermității țesutului
cutanat, hidratante, antiinflamatoare, antioxidante și fotoprotectoare;

37 - *Cremă dermorestitutivă de noapte*, bazată pe asocierea dintre extractul triterpenic
uscat, din *Salvia officinalis folium*, extractul uscat de saponine triterpenice, din *Calendula*
39 *officinalis herba*, și extractul flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, recomandată în prevenirea
proceselor de îmbătrânire, în special anti-fotoîmbătrânire, prin asocierea efectelor complemen-
41 tare și cumulative de: stimulare a turn-overului celular și proteic, hidratare și regenerare epi-
dermală, antioxidant față de stimuli endogeni; protecție celulară față de efectele radiațiilor UV;
43 restaurarea fermității cutanate prin supraexpresia integrinelor $\alpha 2\beta 1$; remodelare dermică și
prevenirea depozitelor de proteine fibrilare dezorganizate;

45 - *Cremă anti-aging*, recomandată persoanelor peste 45 de ani, bazată pe asocierea
dintre extractul izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, extractul uscat de saponine
47 triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și extractul flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*,
care, datorită asocierii fitocompușilor biologic activi cu efecte complementare și cumulative,

prezintă acțiune de tip estrogen mimetică, în sensul stimulării ratei de proliferare celulară, refacerea rezistenței mecanice prin structurarea fibrelor de colagen și inducerea expresiei integrinelor $\alpha 2$ responsabile de fermitatea țesutului cutanat, regenerare epidermală și remodelare dermică și efect fotoprotector, inclusiv de inhibiție a angiogenezei declanșate de radiația UV;

- *Produs de îngrijire a tenului după ras*, condiționat sub formă de gel sau loțiune, adjuvant în terapia anti-aging, bazat pe asocierea dintre extractul izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, extractul uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și extractul flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, care, prin contribuția principiilor active asociate (activitate dermorestitutivă și fotoprotectoare, regenerativă la nivel dermo-epidermic, antioxidantă și antimicrobiană), completează efectul calmant și de revigorare indus de un produs similar clasic, cu acțiuni terapeutice de tip anti-aging și de refacere a structurilor cutanate afectate mecanic;

- *Cremă de mâini cu efect reparator*, bazată pe asocierea dintre extractul uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, extractul triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, și extractul triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, recomandată pentru protecția mâinilor față de agresiunea factorilor de mediu, datorită asocierii efectelor de restructurare dermică, prin stimularea proliferării celulare și a sintezei de colagen, de hidratare și regenerare epidermală, precum și de remodelare a depozitelor de proteine fibrilare dezorganizate, și de protecție față de stimuli oxidativi endogeni;

- *Cremă de remodelare cutanată post-traumatică*, bazată pe asocierea dintre extractul izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, extractul triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, extractul uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, extractul flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, și extractul triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, recomandată în special pentru prevenirea cicatricelor inestetice și favorizarea vindecării rănilor minore, de diferite etiologii (arsuri solare, mici traumatisme, leziuni cutanate etc.), prin cumularea următoarelor acțiuni: stimulare a turn-overului celular și proteic, expresie a integrinelor cu rol de menținere a legăturilor celulă - matrix extracelular - efect de fermitate, protecție și refacere celulară după acțiunea radiației UV; remodelare a depozitelor de proteine fibrilare dezorganizate, și regenerare epidermală, hidratare și efect antioxidant față de stimuli endogeni;

- *Loțiune pentru protecție solară*, bazată pe asocierea dintre extractul triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, și extractul flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, recomandată în cazul expunerii solare prelungite, pentru evitarea efectelor nocive ale radiației UV, prin acțiunea cumulată de protecție celulară față de radiația UV, efect antioxidant față de stimuli endogeni, stimularea sintezei de colagen, regenerarea epidermală și hidratarea, precum și efecte fotoprotectoare adjuvante;

- *Produs antiacneic*, condiționat sub formă de cremă sau loțiune, cu efect de remodelare cicatriceală, bazat pe asocierea dintre extractul izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, extractul uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și extractul triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, alături de extracte de *Arctium lappa*, *Corylus avellana* și *Centaurea cyanus*, recomandată în terapia antiacneică, având avantajele asocierii unor acțiuni de modulare a dezechilibrelor hormonale, cu efectele complementare de prevenire a formării cicatricelor, de remodelare a depozitelor de proteine fibrilare dezorganizate și regenerare epidermală, antiinflamatoare și antimicrobiene.

Procedeul conform invenției constă în obținerea unei game cosmetice prin asocierea originală, în proporții variabile, a extractului triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, extractului uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, extractului triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, extractului izoflavonoidic fluid, din *Trifolium*

RO 128802 B1

1 *pratense herba*, extractului triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, extractului flavonoidic
fluid, din *Viola tricolor herba*, condiționate sub formă de cremă, gel sau loțiune, a căror acțiune
3 biologică, dovedită prin teste specifice, cumulează efectele de refacere a structurilor epidermice
și dermice (prin ansamblul de mecanisme ce stimulează proliferarea celulară, sinteza de
5 colagen și degradarea depozitelor fibrilare dezorganizate, expresia integrinelor $\alpha 1\beta 1$ și $\alpha 2\beta 1$
cu rol de adeziune celulă-matrice extracelulară, diferențierea keratinocitelor și hidratarea
7 epidermală), cu activitatea estrogen-mimetică și cu protecția celulară față de radiația UV
(acțiune antiapoptotică, antiangiogenică, antiinflamatoare și antioxidantă), și anume:

9 - *Cremă dermorestitivă de zi*, caracterizată prin aceea că are în compoziție 0,01...0,5%
extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, 0,5...1,5% extract flavonoidic fluid, din *Viola*
11 *tricolor herba*, și 1...5% extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, alături de ingrediente
cosmetice uzuale, care, prin cumulearea acțiunilor principiilor active la nivel de celulă țintă,
13 conferă produsului proprietăți dermo-restitutive, de refacere a fermității țesutului cutanat,
hidratante, antiinflamatoare, antioxidante și fotoprotectoare;

15 - *Cremă dermorestitivă de noapte*, caracterizată prin aceea că are în compoziție
0,01...0,5% extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, 0,5...1,5% extract uscat de
17 saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și 1...5% extract flavonoidic fluid, din *Viola*
tricolor herba, alături de ingrediente cosmetice uzuale, recomandată în prevenirea procesului
19 de îmbătrânire, în special anti-fotoîmbătrânire, prin asocierea efectelor complementare și
cumulative de: stimulare a turn-overului celular și proteic, hidratare și regenerare epidermală,
21 antioxidant față de stimuli endogeni; protecție celulară față de efectele radiațiilor UV; restaura-
rea fermității cutanate, prin supraexpresia integrinelor $\alpha 2\beta 1$; remodelare dermică și prevenirea
23 depozitelor de proteine fibrilare dezorganizate;

25 - *Cremă anti-aging*, recomandată persoanelor peste 45 de ani, caracterizată prin aceea
că are în compoziție 0,5...3% extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*,
0,05...1,5% extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și 0,3...1%
27 extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale, care,
datorită asocierii fitocompușilor biologic activi cu efecte complementare și cumulative, prezintă
29 acțiune de tip estrogen mimetică, în sensul stimulării ratei de proliferare celulară, refacerea
rezistenței mecanice prin structurarea fibrelor de colagen și inducerea expresiei integrinelor $\alpha 2$
31 responsabile de fermitatea țesutului cutanat, regenerare epidermală și remodelare dermică și
efect fotoprotector, inclusiv de inhibiție a angiogenezei declanșate de radiația UV;

33 - *Produs de îngrijire a tenului după ras*, condiționat sub formă de gel sau loțiune, adju-
vant în terapia anti-aging, caracterizat prin aceea că are în compoziție 0,5...5% extract izoflavo-
35 noidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, 0,05...1,5% extract uscat de saponine triterpenice, din
Calendula officinalis herba, și 0,5...5% extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, alături
37 de ingrediente cosmetice uzuale, care, prin contribuția principiilor active asociate (activitate
dermorestitivă și fotoprotectoare, regenerativă la nivel dermo-epidermic, antioxidantă și
39 antimicrobiană), completează efectul calmant și de revigorare indus de un produs similar clasic,
cu acțiuni terapeutice de tip anti-aging și de refacere a structurilor cutanate afectate mecanic;

41 - *Cremă de mâini cu efect reparator*, caracterizată prin aceea că are în compoziție
0,1...3% extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, 0,5...4% extract
43 triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, și 0,1...3% extract triterpenic hidrolizat uscat, din
Calendula officinalis herba, alături de ingrediente cosmetice uzuale, recomandată pentru pro-
45tecția mâinilor față de agresiunea factorilor de mediu, datorită asocierii efectelor de restructurare
dermică, prin stimularea proliferării celulare și a sintezei de colagen, de hidratare și regenerare
47 epidermală, precum și de remodelare a depozitelor de proteine fibrilare dezorganizate, și de
protecție față de stimuli oxidativi endogeni;

RO 128802 B1

- *Cremă de remodelare cutanată post-traumatică*, ce este caracterizată prin aceea că are în compoziție 1...4% extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, 0,05...2% extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, 0,1...1% extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, 0,3...1% extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, și 1...5% extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale, recomandată în special pentru prevenirea cicatricelor inestetice și favorizarea vindecării rănilor minore de diferite etiologii (arsuri solare, mici traumatisme, leziuni cutanate etc.), prin cumularea următoarelor acțiuni: stimulare a turn-overului celular și proteic, expresie a integrinelor cu rol de menținere a legăturilor celulă - matrix extracelular - efect de fermitate, protecție și refacere celulară după acțiunea radiației UV, remodelare a depozitelor de proteine fibrilare dezorganizate și regenerare epidermală, hidratare și efect antioxidant față de stimuli endogeni;

- *Loțiune pentru protecție solară*, caracterizată prin aceea că are în compoziție 0,02...2% extract triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, și 1...6% extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale, recomandată în cazul expunerii solare prelungite, pentru evitarea efectelor nocive ale radiației UV, prin acțiunea cumulată de protecție celulară față de radiația UV, efect antioxidant față de stimuli endogeni, stimularea sintezei de colagen, regenerarea epidermală și hidratarea, precum și efecte foto-protectoare adjuvante;

- *Produs antiacneic, condiționat sub formă de cremă și loțiune*, cu efect de remodelare cicatriceală, caracterizat prin aceea că are în compoziție 1...5% extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, 0,1...1% extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și 0,01...3% extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, alături de extracte de *Arctium lappa*, *Corylus avellana* și *Centaurea cyanus*, și ingrediente cosmetice uzuale, recomandat în terapia antiacneică, având avantajele asocierii unor acțiuni de modulare a dezechilibrelor hormonale, cu efectele complementare de prevenire a formării cicatricelor, de remodelare a depozitelor de proteine fibrilare dezorganizate, și regenerare epidermală, antiinflamatoare și antimicrobiană.

În scopul cumulării acțiunilor ce converg la protecția completă față de îmbătrânirea cronologică sau foto-îmbătrânire, și al obținerii unor preparate de tip cosmetic cu eficacitate terapeutică demonstrată, fără a conține substanțe active medicamentoase recunoscute, brevetul de invenție propune asocierea următoarelor extracte standardizate:

- extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, sub formă de pulbere purificată, cu un conținut 100% acizi triterpenici, format din minimum 80% acid ursolic și maximum 20% acid oleanolic, hidroxiursolic, hidroxioleanolic, betulinic, dehidrobetulinic, obținut în cantitate de 0,5...1 g/100 g plantă;

- extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, sub formă de pulbere galben cafenie, nehigroscopică, având un conținut de saponine triterpenice ale acidului oleanolic de 50...70%, obținut în cantitate de 2...4 g/100 g plantă;

- extract triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, sub formă de pulbere purificată, cu un conținut 100% acid oleanolic, obținut în urma hidrolizei extractului de saponine triterpenice din *Calendula officinalis herba*, în cantitate de 0,4...0,6 g/100 g plantă;

- extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, condiționat în glicerină, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat în compuși flavonoidici exprimați în quercetină 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, obținut în raport 2:1...1:1 plantă:extract final;

RO 128802 B1

1 - extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, condiționat în glicerină, propilen-
glicol sau butilenglicol, standardizat în agliconi triterpenici hidrolizați, exprimați în acid oleanolic
3 de minimum 0,3%, și în compuși flavonoidici exprimați în rutin de minimum 0,15%, obținut în
raport 1:1...1:2 plantă:extract final;

5 - extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, condiționat în glicerină, propilenglicol
sau butilenglicol, standardizat în compuși flavonoidici exprimați în rutin de minimum 1%, și în
7 acizi polifenolcarboxilici exprimați în acid cafeic de minimum 0,3%, obținut în raport 1:1...1:2
plantă:extract final.

9 Avantajele invenției în raport cu stadiul tehnicii sunt următoarele:

11 - sunt asociate efecte biologice la nivel de celulă țintă, ce acoperă întreaga diversitate
de procese specifice procesului de îmbătrânire și de regenerare a structurilor dermo-
epidermice:

13 - estrogen mimetic și dermo-restitativ - extractul izoflavonoidic fluid, din *Trifolium
pratense herba*;

15 - stimularea ratei de proliferare celulară, a sintezei de colagen și a expresiei integrinelor
responsabile de fermitatea țesutului cutanat - extractul triterpenic uscat, din *Salvia officinalis
folium*, extractul triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*;

17 - regenerare epidermală și prevenirea depozitelor fibrilare imperfecte - extractul uscat
19 de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*;

21 - hidratare - extractul triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, extractul triterpenic
hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, și extractul triterpenic fluid, din *Medicago sativa
herba*;

23 - antioxidant, antiinflamator și fotoprotector prin mecanisme complementare de prevenire
a efectelor radiației UV - extractul triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, extractul
25 triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, extractul uscat de saponine
triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, extractul triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*,
27 și extractul flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*;

29 - acțiunile asociate sunt demonstrate prin tehnici specifice la nivel celular și genetic, ce
conferă precizia efectului declarat.

31 *Testele efectuate în vederea evidențierii activității specifice și evaluării aplicațiilor în
terapeutică a extractelor de: Salvia officinalis, Callendula officinalis, Trifolium pratense, Viola
tricolor și Medicago sativa*

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

35 - pentru evidențierea efectului de refacere a structurilor dermice și a celui estrogen-
mimetic, s-au utilizat fibroblaste dermice umane (HS 27), principalul tip celular responsabil de
37 sinteza proteinelor structurale din matrixul extracelular, și care exprimă receptori pentru
hormonii estrogeni;

39 - pentru evidențierea efectului de regenerare epidermală și a celui fotoprotector, s-a
utilizat linia de keratinocite umane HaCaT - tip celular reprezentativ pentru primul strat al
41 țesutului cutanat, cu funcție de barieră față de acțiunea nocivă a radiației UV.

43 Acțiunea substanțelor s-a evaluat în funcție de relevanța pentru tipul de test respectiv,
fie în cinetică, la 24 h, 48 h și 72 h, sau după 48 h de incubare. Martorul pozitiv pentru
stimularea creșterii fibroblastelor a fost Vitamina C 10 μM.

45 *Efectul de refacere a structurilor dermice indus de componentele cosmetic active*

47 Efectul s-a evidențiat pe culturi de fibroblaste dermice umane (linie celulară selectivă
pentru efectul urmărit), prin date complementare privind următoarele mecanisme:

49 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
51 flux, marcarea cu iodură de propidiu și, respectiv, CFSE - carboxy fluorescein diacetat succin

RO 128802 B1

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 h		48 h		72 h	
	I.P.	%(S+G2/M)	I.P.	%(S+G2/M)	I.P.	%(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 μM	3,60	35,13	4,25	26,80	3,00	7,10
Derrno U 1 μM	3,55	39,42	4,47	28,90	2,75	7,60
Dermo U 3 μM	3,23	38,25	3,60	30,40	3,10	7,40
Dermo Oz 1 μg/ml	2,62	30,20	3,17	20,32	2,80	8,64
Dermo Oz 5 μg/ml	2,38	32,30	2,05	34,28	3,22	7,18
Dermo Oz 10 μg/ml	2,46	33,20	2,01	19,95	3,35	7,23
Vitamina C 10 μM	3,57	46,40	5,22	38,54	3,90	10,20

Dermo U (extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*); Dermo Oz (extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*).

Extractul triterpenic uscat din *Salvia officinalis* acționează imediat asupra fibroblastelor dermice, fiind activ la 24 h de tratare atât asupra proliferării celulare, cât și asupra multiplicării ADN-ului. Extractul uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, are un interval de acțiune mai lent, începând cu 48 h, care se menține și se amplifică în timp.

Efectul de stimulare a proliferării se evidențiază și prin următorii parametri de funcționalitate celulară: pH intracelular și potențialul membranal. Acest parametru funcțional, analizat corelativ cu indicele proliferativ și nivelul de sinteză ADN al celulei, aduce un suport semnificativ al activării *in vitro* a metabolismului fibroblastelor dermale sub acțiunea fitocompușilor, pentru a dovedi, în mod susținut, efectul anti-aging. Analiza pH-ului intracelular s-a efectuat prin marcarea fluorescentă cu BCECF-AM (biscarboxietil carboxi fluoresceina) a cărei intensitate de emisie este dependentă de pH, măsurătorile efectuându-se prin flow-citometrie și analizate ca raport între intensitatea emisie la 525 nm/640 nm.

Extractul triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium* 0,5 μM, crește valoarea pH-ului intracelular la 7,61 vs 7,51 martor celular netratat, ceea ce denotă o ușoară creștere a activității metabolice celulare, corelată cu răspunsul proliferativ; extractul triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba* 5 μM, crește valoarea pH-ului intracelular la 7,76 vs 7,61 control; extractul izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba* 0,2% (v/v), crește valoarea pH-ului intracelular la 7,63 vs 7,48 control; extractul uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba* 10 μg/ml, crește valoarea pH-ului intracelular la 7,70 vs 7,54 control, iar Vitamina C 10 μM (martor pozitiv) determină creșterea valorii pH-ului față de control. Creșterea pH-ului denotă o activitate metabolică proliferativă strâns relaționată cu răspunsul stimulator asupra multiplicării fibroblastelor (parametrii de proliferare celulară, sinteza colagen).

Un al parametru de funcționalitate celulară, analizat pentru a susține și completa rezultatele privind progresia în fazele ciclului celular, este potențialul transmembranar celular. Starea de hiperpolarizare celulară este asociată cu stagnarea ciclului celular în fazele G₁/G₀, și cu un conținut transient de Ca²⁺ intracelular scăzut, în timp ce depolarizarea membranală este corelată cu proliferarea și diferențierea celulară, și creșterea transientă a Ca²⁺. Pentru analiza flow-citometrică a acestui parametru s-au folosit controale pozitive: valinomicina - ionofor selectiv pentru K, a cărui adăugare în mediu determină hiperpolarizarea celulelor;

1 gramicidina care depolarizează celulele în soluții cu concentrații ionice fiziologice. Distribuția
 2 fluorescenței dietiloxacarbocianinei DiOC₂(3) reflectă valorile potențialului membranelor ca urmare
 3 a modificărilor de compoziție ionică a mediului celular. Rezultatele obținute evidențiază
 4 depolarizarea semnificativă a membranei celulare indusă de extractul triterpenic uscat, din
 5 *Salvia officinalis folium* 0,5 μM, 1 μM și 3 μM, și extractul izoflavonoidic fluid, din *Trifolium*
 6 *pratense herba* 0,2% și 0,1% (v/v), precum și de extractul uscat de saponine triterpenice, din
 7 *Calendula officinalis herba* 5 μg/ml. Depolarizarea membranelor indusă de fitocomplecși poate
 8 fi relaționată cu capacitatea acestora de a determina creșterea fazei S a ciclului celular la
 9 aceleași doze testate. Depolarizarea membranelor indusă de compușii extractului triterpenic
 10 uscat, din *Salvia officinalis folium*, extractului uscat de saponine triterpenice, din *Calendula*
 11 *officinalis herba*, și extractului izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, se poate corela
 12 cu valorile crescute ale pH-ului intracelular, acesta fiind influențat considerabil de concentrația
 13 ionilor determinanți de potențial transmembranal.

14 b) *Modularea sintezei proteice și a activității metaloproteinazelor, precum și a TGFβ, proteina cheie în homeostazia colagenului*

15 Modularea sintezei de colagen de către extractul triterpenic uscat, din *Salvia officinalis*
 16 *folium*, extractul uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și extractul
 17 triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, a fost investigată prin dozarea
 18 hidroxiprolinei din mediul de cultură al fibroblastelor tratate cu substanțele test [Si Eun Lee,
 19 Hwang, H. J., Kim, J. H., (2003) *Life Sciences* 73, 167-179].

20 Degradarea colagenului din matricea extracelulară se datorează activității proteolitice
 21 a metaloproteinazelor (MMP) exprimate atât de fibroblastele dermice, cât și de celulele infla-
 22 matorii, cu rol important în remodelarea matriceală de la nivelul pielii supuse proceselor infla-
 23 matoare de lungă durată [Kähäri V-M, Saarialho-Kere U. (1997) *Matrix metalloproteinases*
 24 *in skin. Exp Dermatol* 6:199-213].

25 Pentru a investiga efectul biocomplexelor asupra metabolismului componentelor din
 26 matricea extracelulară, au fost studiate două gelatinaze: MMP-2 și MMP-9, rezultatele experi-
 27 mentale obținute fiind prezentate în tabelul de mai jos:

		Colagen				MMP							
		μg OH-Pro/2*10 ⁵ celule/MI 2*10 ⁵				MMP9 (Gelatinaza B)				MMP2 (Gelatinaza A)			
		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		4,6		24,65		16,12		39,78		
Dermo U	0,5 μM	0,975	-10,15	1,947	34,3	4,26	-7,4	22,94	-6,9	22,89	29,6	51,73	23,1
	1 μM	1,210	11,24	2,642	51,6	3,44	-25,2	22,02	-10,7	19,20	16,04	56,15	29,15
Dermo Oz-8	1 μg/ml	5,36	79,9	3,54	63,8	9,03	49,1	22,66	-8,1	23,79	32,2	50,78	21,66
	5 μg/ml	4,430	75,76	3,94	67,5	9,18	49,9	24,65	-12,2	2,44	36,63	53,78	26,03
	10 μg/ml	3,75	71,36	3,11	58,8	7,25	36,6	20,17	-18,17	31,75	49,22	55,82	28,73
Dermo O	5 μM	2,81	61,779	4,39	70,8	4,39	-4,6	26,97	8,6	17,05	5,45	50,44	21,12
	10 μM	3,31	67,56	5,13	75,05	3,92	-14,8	26,11	5,59	25,21	36,05	50,45	21,14
	15 μM	3,13	65,69	5,21	75,5	3,94	-14,3	22,85	-7,3	26,40	38,9	56,94	30,14

51 Dermo U (extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*); Dermo Oz (extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*); Dermo O (extract triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*).

RO 128802 B1

Extractul uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și extractul triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, induc, într-o manieră dependentă de doză aplicată, atât biosinteza colagenului, cât și activarea MMP2, în timp ce MMP9 la 48 h este puternic activată de către extractul uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și ușor inactivată de extractul triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*. Testat în condiții similare, extractul triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, activează MMP2 după 48 h, și stimulează acumularea de colagen biosintetizat după 72 h.

Modularea TGF β - proteină cheie în homeostazia colagenului - s-a realizat prin citometrie în flux - tehnica de detecție a analiților solubili prin cuplare cu beads-i de captură fluorescenți: Kiturile (Human TGF beta 1 Single Plex Flex Set și Human Soluble Protein Mașter Buffer Kit - BD CBA).

Rezultatele, exprimate în ng/ml TGF- β , sunt prezentate în tabelul de mai jos.

La 48 h de acțiune, extractul triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba* 10 μ M, și extractul triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium* 0,5 μ M, acționează în sensul creșterii concentrației de TGF-beta în mediul extracelular, ceea ce poate conduce la inhibiția activității metaloproteinazelor, și la stimularea sintezei de colagen, în sensul reconstrucției matrixului extracelular, cu efect în îmbătrânirea cronologică intrinsecă. Extractul uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba* 1 μ M și 10 μ M, inhibă secreția de TGF- β , cu implicații în activarea metaloproteinazelor, având acțiune antifibrotică pozitivă în procesul de vindecare tisulară și foto-îmbătrânire.

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

Dermo U (extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*); Dermo Oz (extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*); Dermo O (extract triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*).

După 72 h de acțiune, extractul triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba* 10 μ M, și extractul triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium* 0,5 μ M, își mențin acțiunea de stimulare a secreției TGF- β . Extractul uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba* 1 μ M, își menține efectul de inhibare a TGF- β , ceea ce indică activarea metaloproteinazelor și acțiune de remodelare tisulară.

c) *Expresia integrinelor $\alpha 1\beta 1$ și $\alpha 2\beta 1$, cu rol de adeziune celulă-matrice extracelulară*

Integrina $\alpha 1\beta 1$ mediază feed-back-ul de reglare a sintezei de colagen, realizând legături de tip celulă-colagen sau celulă-laminină1 din matrixul extracelular, iar Integrina $\alpha 2\beta 1$ mediază stimularea colagenazei de tip I (MMP1), cu rol în fibrilogeneză (organizarea colagenului în

RO 128802 B1

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 [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(1) gene expression”, J. Biol. Chem. 270:13548-13552, 1995; Zhang Z., Bothe I., Hirche F., Zweers M. C., Gullberg D., Pfitzer G. et. al.; „Interactions of primary fibroblasts and keratinocytes with extracellular matrix proteins: contribution of alpha-2beta-1 integrin”, J. Cell. Sci., 119:1886-1895, 2006; Fujimura T., Moriwaki S., Imokawa G., Takema Y., „Crucial role of fibroblast integrins alpha 2 and beta1 in maintaining the structural and mechanical properties of the skin”, J. Dermatol Sci. Jan.: 45(I): 45-53. 2007]. Testele s-au realizat prin tehnica de evidențiere a integrinelor prin citometrie în flux, ce utilizează anticorpi monoclonali pentru lanțurile α și β (CD 49a, marcat fluorescent pentru PE, corespunzător subunității $\alpha 2$; CD 49b, marcat fluorescent pentru FITC, corespunzător subunității $\alpha 1$; și CD 29 marcat fluorescent pentru APC, corespunzător subunității $\beta 1$). Rezultatele (media a 3 teste) sunt prezentate în tabelul de mai jos, sub forma medianei canalelor de fluorescență corespunzătoare expresiei celor 3 lanțuri glicoproteice:

Substanța testată	FITC-A Mean (CD 49b- Integrina $\alpha 2$)	% de variație	PE-A Mean (CD 49a -Integrina $\alpha 1$)	% de variație	APC-A Mean (CD 29- Integrina $\beta 1$)	% de variație
MARTOR	14448,00		5837,00		5310,67	
DMSO	13759,67	-4,76	6206,33	6,53	6206,33	16,88
TGF beta 4 ng/ml	46264,00	220,21	7005	20,01	7005	31,92
Dermo U 0,5 μ M	21138	46,30	5005,00	-14,25	5005,00	-5,74
Dermo U 1 μ M	23410	62,03	5115,00	-12,37	5115,00	-3,67
Derm U 3 μ M	10691	-26,00	3925,0	-32,76	3925	-26,08
Dermo O 5 μ M	27155	87,95	4600,00	-21,19	4600,00	-13,37
Dermo O 10 μ M	14364,3	-0,58	4829,67	-17,26	4829,67	-9,05
Dermo O 15 μ M	10827	-25,06	4744,0	-18,73	4744	-10,66
Dermo Oz 5 μ g/ml	30387	110,32	5255,0	-9,97	5255	-1,04
Dermo Oz 10 μ g/ml	37317	158,28	6153,0	5,41	6153	15,88

Dermo U (extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*); Dermo Oz (extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*); Dermo O (extract triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*).

S-a evidențiat acțiunea extractului triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium* 0,5 μ M și 1 μ M, a extractului triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba* 5 μ M, și a extractului uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba* 5 și 10 μ M, doar asupra inducerii supraexpresiei lanțului glicoproteic $\alpha 2$, ceea ce indică o amplificare a legăturilor fibroblast-colagen de tip I, și stimularea activității collagenazei cu rol în fibrilogeneză. Efectul determinat este similar cu cel al martorului pozitiv (TGF beta 4 ng/ml).

d) Expresia genelor responsabile de restructurarea matrixului dermic

S-a urmărit expresia de gene specifice desfășurării anumitor mecanisme celulare ce reflectă efectul anti-aging, analizându-se următoarele gene: colagen tip I, III și elastina ce codifică principalele proteine din matricea dermală care conferă susținere și elasticitate; metalo-proteinaza-1, ca protează în principal a colagenului de tip I; TIMP-1 (tisular inhibitor MMP-1) ca inhibitor fiziologic al MMP-1, și lisil-oxidaza cu rol de conversie a tropoelastinei în elastina

RO 128802 B1

insolubilă, prin desaminare oxidativă, precum și în cross-link-ul fibrelor de colagen. Extractul triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, manifestă acțiune anti-aging în maniera dependentă de doză, având efect semnificativ asupra sintezei colagenului cu efect concomitent asupra MMP-1, și de inhibare proporțională a acesteia, prin activarea TIMP-1. Extractul triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba* 15 μM, asigură un efect anti-aging prin stimularea turn-over-ului moleculelor cheie implicate în funcția de susținere a țesutului conjunctiv dermal. Extractul izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, manifestă efect semnificativ asupra lisil-oxidazei - enzimă cu rol în maturarea fibrelor de colagen.

	COL-1 (colagen tip I)			COL-3 (colagen tip III)			MMP-1 (metaloproteinaza 1)			TIMP-1 (inhibitor tisular al MMP-1)			ELN(elastina)			LOX(lisil oxidaza)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48h	72 h	24 h	48 h	72 h
Dermo-U 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 Mm	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
Dermo-O 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	0,733	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
Dermo-ET 1/500	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
1/1000	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

+ indică faptul că fitocompusul are efect de up-reglare a expresiei genei respective, raportat la martorul netratat Dermo U (extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*); Dermo O (extract triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*); Dermo ET (extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*).

Demonstrarea efectului estrogen mimetic al extractului izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*

Efectul s-a evidențiat pe culturi de fibroblaste dermice umane (linie celulară selectivă pentru efectul urmărit), prin date complementare la nivelul ratei de multiplicare celulară și al stimulării sintezei de colagen, precum și al modulării activității metaloproteinazelor.

Extractul izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, 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 depleție estrogenică (ser fetal fără estrogeni). S-a analizat statusul proliferativ celular prin 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 succinimid 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 compușilor asupra liniilor celulare standardizate de fibroblaste umane normale (HS 27), comparativ cu martorul pozitiv (β-estradiolul InM).

RO 128802 B1

	Mediu cu conținut normal de estrogeni			Mediu fără estrogeni				
	% faza S+G 2/M	% de variație	Indice proliferare	% de variație	% faza S+G 2/M	% de variație	Indice proliferare	% de variație
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 ET 1/2000	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	157,3	6,0	149,2
Biochanina echivalent Dermo ET 1/2000	51,3	118,3	2,4	-32,0	48,7	163,2	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 β-estradiol 1 nM	53,6	128,1	3,48	-0,6	54,6	195,1	4,11	71,3

Dermo ET (extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*).

Extractul izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, stimulează rata de proliferare celulară a fibroblastelor atât în condiții normale de dezvoltare celulară, cât și în condiții de depleție estrogenică, similar cu estrogenul sintetic, β-estradiolul. Efectul estrogen-mimetic este demonstrat de fiecare component al amestecului de izoflavone, în special de daidzeină, formononetin și biochanină în ceea ce privește rata de sinteză ADN și inițierea mitozei în cadrul ciclului de diviziune celulară.

În tabelul de mai jos este prezentat efectul extractului izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, asupra statusului colagenului din matricea extracelulară a culturii de fibroblast normal linia HS27.

Substanța	Colagen μg OH-Pro/2*10 ⁶ celule/ml				MMP							
					MMP9				MMP2			
	Cu estradiol		Fără estradiol		Cu estradiol		Fără estradiol		Cu estradiol		Fără estradiol	
		%		%		%		%		%		%
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 β-estradiol 1nM	0,0512	-39,1	0,1153	42,7	90,49	1,5	30,05	-146	93,77	0,5	68,73	-36

Substanța	Colagen $\mu\text{g OH-Pro}/2 \cdot 10^5 \text{celule/ml}$				MMP							
					MMP9				MMP2			
	Cu estradiol		Fără estradiol		Cu estradiol		Fără estradiol		Cu estradiol		Fără estradiol	
		%		%		%		%		%		%
Genisteina echivalent Dermo ET 1/2000	0,0287	-	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
DermoET 1/1000	0,1012	39,03	0,0881	35,6	73,18	-28	69,23	-6,7	94,61	1,4	93,74	0,6
DermoET 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	0,0786	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	-	0,0690	17,8	91,04	2,1	28,36	-161	95,86	2,7	62,41	-49

Dermo ET (extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*).

Daidzeina induce, la nivelul fibroblastelor menținute în condiții normale de creștere, atât biosinteza colagenului de tip I și III, cât și inactivarea enzimei proteolitice MMP9, ajutând astfel la creșterea cantității de proteine structurale, pentru reconstrucția matrixului extracelular. Ceilalți fitohormoni analizați individual (genisteina, biochanina și formononetinul) inhibă enzimele proteolitice matriceale, dar nu intervin în procesul de biosinteză a colagenului. În schimb, asocierea acestor fitohormoni în diferite combinații potențează cu cel puțin 13,5% efectele daidzeinei, aspect observat și în cazul extractului izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*. De asemenea, acesta reechilibrează homeostazia colagenului în condiții de depleție estrogenică, aducându-l la valori apropiate de cele obținute în condiții normale de creștere, acționând în special asupra căii metabolice de biosinteză, și mai puțin asupra enzimelor degradative. Daidzeina și genisteina, într-o manieră dependentă de doză aplicată, induc biosinteza colagenului, însă nu manifestă niciun efect asupra enzimelor proteolitice în medii lipsite de estrogeni.

Efectul de regenerare și hidratare epidermală

Efectul s-a evidențiat pe culturi de keratinocite immortalizate (linie celulară selectivă pentru efectul urmărit), prin date privind următoarele mecanisme:

- modularea proliferării celulare și diferențierea evidențiată prin markeri specifici;
- expresia genică a moleculelor implicate în hidratarea epidermală.

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.

RO 128802 B1

Regenerare epidermală																
Fitocompus analizat	Proliferare celulară							Diferențiere celulară (geometric mean)								
	Ciclu celular %			Apoptoza %				Citokeratina 5/14			Transglutaminaza-1			Involucrina		
	G1	S	G2	Celule vii	Apoptoza timpurie	Apoptoza târzie	Ne-croza	6,7 mg Ca ²⁺	3 mg Ca ²⁺	11,2 mg Ca ²⁺	6,7 mg Ca ²⁺	3 mg Ca ²⁺	11,2 mg Ca ²⁺	6,7 mg Ca ²⁺	3 mg Ca ²⁺	11,2 mg Ca ²⁺
Martor celular	65,38	31,40	3,23	95,85	1,65	0,78	1,72	245,63	260,37	255,2	595,59	600,43	1100,08	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	924,33	2933,13	2114,08	2506,82
Dermo-U	63,30	24,08	7,12	95,11	2,91	0,36	1,12	273,03	249,6	267,6	570,06	638,54	366,85	1927,62	3712,29	2338,06
2338,061 μM																
3 μM	69,98	22,4	7,58	93,49	3,16	1,38	1,97	214,95	253,39	337,08	625,31	548,2	568,26	2497,29	3192,14	1944,62
5 μM	67,68	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	2653,93	3006
Dermo-O	72,7	23,3	6,0	91,54	2,92	2,63	2,91	205,1	236,22	258,84	500,79	875,77	1037,91	1591,58	2308,85	2305,95
5 μM																
10 μM	76,8	18,66	4,54	92,90	4,80	0,95	1,34	260,89	259,76	236,58	598,44	861,73	891,83	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	62,71	37,20	0,1	96,38	1,18	0,36	2,08	236,03	240,01	233,64	507,45	471,29	5695	2052,02	1762,0	2701,48
5 μg/ml																
10 μg/ml	62,74	37,10	0,16	96,16	1,42	0,37	2,01	261,29	256,64	414,6	1080,58	727,03	318,75	3329,47	2221,51	2315,43

Dermo U (extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*); Dermo Oz (extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*); Dermo O (extract triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*).

Extractul triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium* 5 μM, extractul uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba* 10 μg/ml, și extractul triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba* 5 μM, 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.

b) Expresia genică a moleculelor implicate în hidratarea epidermală

Au fost analizate următoarele gene ce codifică molecule cu rol cheie în acest proces de hidratare epidermală: filagrina - genă ce codifică profilagrina în straturile superioare ale epidermei (stratul granulos), și intră în compoziția granulelor de keratohialină. Filagrina la joncțiunea strat granulos-strat cornos este degradată de caspaza-14, cu formarea factorilor de hidratare. Caspaza-14 - genă analizată ce codifică molecula cu același nume, și care se exprimă la nivelul stratului granulos al epidermei. UGCG (glucozilsintetaza) - genă ce codifică enzima cu rol în sinteza glucozilceramidelor în corpii lamelari ai keratinocitelor diferențiate, și care, ulterior, sunt eliberate extracelular, cu rol de blocare a pierderii de apă din piele. Extractul triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, extractul triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, și extractul triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, au fost testate în condiții de stimulare a diferențierii keratinocitelor cu CaCl₂ și fără stimulare a diferențierii celulare. Keratinocitele diferențiate corespund statusului fiziologic celular de la nivelul straturilor superioare ale epidermului, în principal stratului granulos. Rezultatele prezentate în tabelul de mai jos ne-au indicat:

RO 128802 B1

Rezultate expresie genică, % vs control																
Fito-com-pus analizat	24 h acțiune substanță				48 h acțiune substanță						72 h acțiune substanță					
	celule nediferențiate		celule diferențiate		celule nediferențiate			celule diferențiate			celule nediferențiate			celule diferențiate		
	FLG (fila-grina)	UGCG (gluco-zil sintetaza)	FLG (fila-grina)	UGCG (gluco-zil sintetaza)	FLG (fila-grina)	UGCG (gluco-zil sintetaza)	CASP 14 (cas-paza 14)	FLG (fila-grina)	UGCG (gluco-zil sintetaza)	CASP 14 (cas-paza 14)	FLG (fila-grina)	UGCG (gluco-zil sintetaza)	CASP 14 (cas-paza 14)	FLG (fila-grina)	UGCG (gluco-zil sintetaza)	CASP 14 (cas-paza 14)
Dermo-U	+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	+2	+2,22	+0,17
5 μM																
7 μM	0,54	0,826	+1,3	+1,6	+1,06	+1,538	+0,28	+11	+0,2	+0,76	+2,5	0,763	0,088	+0,8	+1,2	
Dermo-O	+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	+3,6	+2,9	+0,03
5 μM																
10 μM	+1,7	+1,5	0,34	0,78	0,2	0,735	0,263	0,6	+0,4	+0,448	+0,515	0,875	0,023	0,963	0,865	0,912
Dermo-Oz	0,621	0,75	+0,06	+0,21	+0,23	0,35	+0,06	+0,592	0,315	0,028	+0,754	0,217	0,36	0,363	0,359	0,078
5 μg/l																
10 μg/l	0,759	0,85	+0,3	+0,06	+0,09	0,06	0,985	+1,046	0,529	0,018	+1,9	0,353	0,203	0,673	0,652	0,46
Dermo-ET5	0,853	+0,02	0,988	+0,4	+0,15	0,836	0,85	+0,35	0,756	0,677	+1,49	+0,7	0,168	0,977	0,361	0,069
1/500																
1/1000	0,653	0,752	0,852	+0,06	0,419	0,623	0,365	0,652	0,647	0,525	+0,037	+0,22	0,759	+0,03	0,427	0,218
Dermo-L	0,991	+3,3	0,375	0,721	+1,2	+0,5	+0,9	0,497	0,332	0,186	+0,21	+0,16	+2,58	+0,3	+0,45	+3,27
1/3000																
1/4000	+0,061	+0,127	+1,689	+0,604	+1,061	+0,193	0,852	+1,9	+2,44	+1,81	+0,266	+0,347	0,919	+0,182	+0,581	+0,602

Dermo U (extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*); Dermo Oz (extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*); Dermo O (extract triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*); Dermo ET (extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*); Dermo L (extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*)

"+" indică faptul că fitocompusul are efect de up-reglare a expresiei genei respective, raportat la martorul netrat.

Extractul triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, are rol important în activarea genic a principalelor molecule responsabile de hidratarea epidermală. Extractul uscat triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba* 5 μM și 10 μM, determină creșterea proporțională a expresiei genelor, efectul intensificându-se la 48 h, și manifestând o reducere moderată la 72 h, menținându-se efectul fitocompusului asupra celor trei gene de hidratare. Extractul triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, induce expresia genelor pentru hidratare epidermală, manifestând un efect susținut și la 72 h.

Efectul fotoprotector

S-a demonstrat acțiunea preparatelor - extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, și extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, în patogeneza foto-îmbătrânirii, printr-un screening al următorilor parametri celulari:

- inducerea apoptozei declanșată de modificări la nivel de ADN;
- stres oxidativ celular - activarea intracelulară a speciilor de oxigen reactive, gradul de peroxidare lipidică și intervenția sistemelor antioxidante endogene - superoxid dismutaza, catalaza;
- status inflamator: secreția citokinelor pro-inflamatorii (IL6, IL8), a III-α ca indicator de sensibilizare și iritabilitate;

RO 128802 B1

1 - secreția factorului VEGF (vascular endothelial growth factor) - promotor de angio-
 2 geneză - etapă cheie în refacerea țesutului cutanat degradat, și în vindecarea rănilor.

3 Centralizarea efectelor cumulative fotoprotectoare ale extractelor testate este prezentată
 4 în tabelele de mai jos (comparativ cu martorul pozitiv N-acetilcisteina 10 mM):

Compusul testat		CAT (nmol/min/ml)			SOD (U/ml)			Peroxidare lipidică (nmol MDA/ml)		
		Fără iradiere	UVA iradiere	UVB iradiere	Fără iradiere	UVA iradiere	UVB iradiere	Fără iradiere	UVA iradiere	UVB iradiere
Martor celular		1,6434	0,2494	0,0165	2776,8	595	1,30	0,086	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	0,75 ml	0,8988	0,2670	0,0209	2951	675	2,25	0,0889	0,0996	0,0379
	1,5 ml	1,8216	0,3921	0,324	3495	875	4,32	0,01122	0,0827	0,0914
Dermo L	0,375	0,375	0,08593	0,3665	0,0282	2261	618	2,96	0,0843	0,089
	0,75	0,2898	0,2399	0,0245	1734	520	2,05	0,0832	0,093	0,0793

17 Dermo ET (extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*); Dermo L (extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*).

Substanță testată/Efect biologic	Iradie UV-A									
	Protecție față de apoptoză				Inhibiție IL1 α (pg/ml)	Inhibiție VEGF (pg/ml)	Inhibiție Citokine pro-inflamatorii		Inhibiție Stres oxidativ	
	% celule vii	% celule apoptotice timpurii	% celule apoptotice târzii	% celule necrotice			IL6 (pg/ml)	IL8 (pg/ml)	Mediana canalului de fluorescență FITC-A (H ₂ O ₂)	Mediana canalului de fluorescență 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	50,4	40,9	8,2	0,5	371,92	371,92	143,76	521,73	28321	18723
Dermo-L 1/2000	29,7	28,4	35,4	6,4	445,12	141,93	108,7	327,8	28076	22859
Dermo-L 1/4000	29,0	32,0	30,8	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	583,1	28564	18774
N-Acetilcisteina	65,1	20,3	8,3	6,3	289,85	220,65	105,8	120,8	17896	16254

51 Dermo ET (extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*); Dermo L (extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*); Dermo 3FP (extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*).

RO 128802 B1

Substanță testată/Efect biologic	Iradiere UV-AB									
	Protecție față de apoptoză				Inhibiție IL1 α (pg/ml)	Inhibiție VEGF (pg/ml)	Inhibiție Citokine pro-inflamatorii		Inhibiție Stres oxidativ	
	% celule vii	% celule apoptotice timpurii	% celule apoptotice târzii	% celule necrotice			IL6 (pg/ml)	IL8 (pg/ml)	Mediana canalului de fluorescență FITC-A (H ₂ O ₂)	Mediana canalului de fluorescență PE-A (O ₂)
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
Dermo-ET 1/500	64,6	30,9	4,2	0,3	202,69	529,57	833,11	1725,04	23078	18823
Dermo-ET 1/1000	64,2	32,1	3,4	0,2	237,61	498,67	870,99	2241,54	27978	23417
Dermo-L 1/2000	60,3	16,8	16,1	6,9	227,54	317,16	653,3	2043,3	21633	19366
Dermo-L 1/4000	66,6	15,1	12,6	5,7	259,66	336,83	608,3	1987,5	21164	19725
Dermo-3FP 1/2000	74,3	21,7	3,9	0,1	309,23	410,02	806,5	2089,4	22014	18557
Dermo-3FP 1/3000	74,2	21,8	3,9	0,1	339,18	276,17	812,3	2127,5	20115	17336
N-Acetilcisteina	71,1	23,3	5,3	0,2	289,85	320	458	1208	18774	15443

Dermo ET (extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*); Dermo L (extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*); Dermo 3FP (extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*).

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

- extractul izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, 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 puternic, acționând la nivel enzimatic, cu consecințe asupra reducerii intracelulare a speciilor de oxigen reactive, în special în condițiile iradierii UV-A;

- extractul triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, previne apoptoza celulară, stopează progresia inflamației (efect antiiritativ - anti-IL 1 α ; antiinflamator - anti-IL6 și -IL8) - în cazul arsurilor solare (iradiere UV-B), inhibă factorul VEGF de progresie a angiogenezei în ambele situații de iradiere UV, acționează la nivelul enzimelor implicate în protecția oxidativă, cu consecințe asupra reducerii intracelulare a speciilor de oxigen reactive;

- extractul flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, are efect de protecție celulară față de apoptoza indusă de radiația UV-A și UV-B, are activitate antioxidantă prin scăderea nivelului intracelular al speciilor de oxigen reactive, și reduce angiogeneza în ambele situații de iradiere UV.

RO 128802 B1

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

3 Efectul antioxidant și fotoprotector

5 Pentru evidențierea acțiunii antioxidate a extractelor, s-au efectuat teste pe linii celulare de keratinocite, în condiții de stimulare cu PMA (acetat de forbol miristat) 1 μM, timp de 24 h, ca stimul oxidativ endogen, sub acțiunea concomitentă a substanțelor active de testat. PMA are rol de activare a NADPH oxidazei, enzimă cu rol în cataliza formării radicalilor liberi de oxigen (anionul superoxid care poate fi redus ulterior la peroxid de hidrogen). Radicalii liberi de oxigen (anionul superoxid care poate fi redus ulterior la peroxid de hidrogen). Radicalii liberi de oxigen aflați în exces induc numeroase injurii la nivelul acizilor nucleici, proteinelor și lipidelor, generând anomalii genetice, precum și derivați lipidici și proteici oxidați, cu efecte dăunătoare asupra celulei. Evaluarea efectului antioxidant s-a efectuat prin flow-citometrie, prin analiza emisiei fluorescenței după marcarea specifică a anionului superoxid și peroxidului de hidrogen atât în condiții de nestimulare, cât și de stimulare cu PMA.

15 Extractul triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, determină reducerea speciilor reactive de oxigen (O_2^- și H_2O_2) la concentrația de 7 μM, în condiții de simulare a stresului oxidativ endogen. Extractul triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba* 15 μM, scade semnificativ nivelul peroxidului de hidrogen la stimularea PMA. Extractul uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba* - 5 și 10 μg/ml, prezintă efect antioxidant remarcabil, acționând prin anihilarea ambelor specii reactive de oxigen, la producerea intrinsecă în exces a acestora. Efectul antioxidant, manifestat prin reducerea peroxidului de hidrogen/anion superoxid, denotă un mecanism de acțiune orientat fie către anihilarea directă a anionului O_2^- , sintetizat sub acțiunea NADPH oxidazei, fie către activarea sistemului enzimatic antioxidant (superoxid dismutază/catalază).

Fitocompus analizat	Celule nestimulate ca PMA		Celule stimulate ca PMA 1 μM timp de 24 h	
	Anion superoxid (O_2^-)	Peroxid de hidrogen (H_2O_2)	Anion superoxid (O_2^-)	Peroxid de hidrogen (H_2O_2)
	Media geometrică			
Martor celular	4138	9079	12268	17104
Martor solvent (DMSO)	3430	2459	15507	16420
Dermo-U) 3 μM	3720	2403	17456	21411
Dermo-U 5 μM	3999	4170	15114	10557
Dermo-U 7 μM	3720	2403	11053	7099
Dermo-O 5 μM	4368	3508	13920	9903
Dermo-O 10 μM	4502	4982	14642	10996
Dermo-O 15 μM	4841	5269	14912	9179
Dermo-Oz 5 μg/ml	4949	13598	4724	1842
Dermo-Oz 10 μg/ml	4794	10834	5349	8539
Vitamina C 30 μM	4977	14473	3801	7018

43 Dermo U (extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*); Dermo Oz (extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*); Dermo O (extract triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*).

RO 128802 B1

Acțiunea fotoprotectoare a extractelor a fost determinată prin analiza flow-citometrică a speciilor reactive de oxigen (O_2^- și H_2O_2) la scurt timp (4 h) după iradierea cu UVA (8 J/cm ²) și UVB (0,02 J/cm ²), și la un interval de timp mai lung (24 h) după iradiere, când s-au evidențiat și efectele induse de nivelul crescut al ROS asupra mecanismelor de declanșare a apoptozei, și trecerii celulelor în diferite faze care stagnează sau accelerează ciclul celular. Keratinocitele (linia celulară HaCaT) au fost tratate cu fitocompuși timp de 24 h, înainte de expunerea acestora la radiațiile UV. Proprietățile fotoprotectoare pentru o substanță sunt definite fie de rolul de filtru UV, fie de efectul acesteia de anihilare imediată a efectelor nocive induse de radiații. Fitocompușii studiați au capacitatea de restricționare imediată (4 h după iradiere) a producerii speciilor reactive de oxigen (ROS), comparativ cu martorul netratat.	1 3 5 7 9
Extractul triterpenic uscat, din <i>Salvia officinalis folium</i> :	11
- asigură o barieră de protecție antiradicalară imediat după expunerea UV, în condițiile în care martorul netratat prezintă un nivel semnificativ ridicat al ROS;	13
- prezintă un efect remarcabil de frânare a proliferării aberante a celulelor, declanșată de expunerea în special la UVB, nefiind observate efecte de propulsare semnificativă a celulelor în etape avansate ale apoptozei;	15
- are rol de prevenire imediată a proceselor oxidative induse de radiațiile UVA și UVB.	17
Extractul triterpenic hidrolizat uscat, din <i>Calendula officinalis herba</i> , manifestă acțiune similară cu extractul triterpenic uscat, din <i>Salvia officinalis folium</i> , în privința protecției imediate la expunerea UVA și UVB, și numai doza de 15 μM prezintă și acțiune de contracarare a factorilor declanșatori ai proceselor proliferative aberante după iradiere UVB.	19 21
Extractul uscat de saponine triterpenice, din <i>Calendula officinalis herba</i> , are același rol de protecție imediat după iradiere ca și extractul triterpenic hidrolizat uscat, din <i>Calendula officinalis herba</i> , și manifestă acțiune similară cu extractul triterpenic uscat, din <i>Salvia officinalis folium</i> , evidențiindu-se însă un efect antioxidant susținut și la 24 h. Pentru extractul uscat de saponine triterpenice, din <i>Calendula officinalis herba</i> 5 μg/ml și 10 μg/ml, funcția fotoprotectoare este demonstrată și de efectul de limitare a avansării fazelor apoptotice, fiind redus semnificativ procentul de celule în necroză vs. martor netratat.	23 25 27

RO 128802 B1

Tabel

Fito-compus analizat	Celule neiradiate (martor la 4 h după iradiere)		4 h după iradiere				Celule neiradiate (martor la 24 h după iradiere)		24 h după iradiere																	
	stres oxidativ		stres oxidativ (media geometrică)				stres oxidativ		stres oxidativ				ciclu celular						apoptoză							
	H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	UVA 8 J/cm ²		UVB 0,02 J/cm ²		H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	UVA 8 J/cm ²		UVB 0,02 J/cm ²		UVA 8 J/cm ²			UVB 0,02 J/cm ²										
			H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂	O ₂ ⁻			H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	G1%	S%	G2%	G1%	S%	G2%	Celule vii%	Apop-toza timpurie %	Apop-toza târzie %	Ne-croza %	Celule vii %	Apop-toza timpurie %	Apop-toza târzie %	Ne-croza %
Martor celular	4138	9079	11089	9586	7526	7588	214	4140	272	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	8953	221	4056	292	4195	347	5495	35	44	22	21	78	1,0	83,5	7,13	7,57	1,80	72,72	9,10	8,97	9,20
Dermo-U 3 μM	3720	2403	2932,4	5149	3212	5216	213	3983	306	4091	353	5532	34	46	20	59	40	1,0	78,4	8,63	9,67	3,28	73,77	6,52	7,92	11,78
Dermo-U 5 μM	3999	4170	51159	6365	6257	6559	216	4216	325	4182	377	10388	34	46	20	52	39	9,0	79,6	7,37	10,39	2,62	74,74	4,45	12,92	7,88
Dermo-U 7 μM	3720	2403	3582	5995	2700	4408	216	4172	348	4875	398	10207	36	48	16	19	80	1,0	73,32	9,47	15,54	1,67	64,71	6,07	20,99	8,23

RO 128802 B1

Tabel (continuare) 1

Fito-compus analizat	Celule neiradiate (martor la 4 h după iradiere)		4 h după iradiere				Celule neiradiate (martor la 24 h după iradiere)		24 h după iradiere																	
	stres oxidativ		stres oxidativ (media geometrică)				stres oxidativ		stres oxidativ				ciclu celular						apoptoză							
	H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	UVA 8 J/cm ²		UVB 0,02 J/cm ²		H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	UVA 8 J/cm ²		UVB 0,02 J/cm ²		UVA 8 J/cm ²			UVB 0,02 J/cm ²										
			H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂	O ₂ ⁻			H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	G1%	S%	G2%	G1%	S%	G2%	Celule vii %	Apop-toza timpurie %	Apop-toza târzie %	Ne-croza %	Celule vii %	Apop-toza timpurie %	Apop-toza târzie %	Ne-croza %
Dermo-OZ 5 μM	4949	13598	11506	9139	6763	7569	220	4023	241	3889	418	10489	31	47	22	18	81	1,0	77,46	6,30	14,69	1,55	78,48	3,97	6,17	11,39
Dermo-Oz 10 μM	4794	10834	5209	6353	8179	7599	217	4605	322	3015	388	10845	37	60	3	28	71	1,0	76,15	9,05	12,57	2,26	82,77	2,62	4,95	9,66
Vitamina C10 μM (martor pozitiv)	4977	14473	16289	11415	9400	9781	250	4380	501	5970	365	9342	37	45	18	18	80	2,0	86,36	3,61	7,91	2,13	64,81	4,45	19,69	11,05

Dermo U (extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*); Dermo Oz (extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*); Dermo O (extract triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*).

RO 128802 B1

1 Obiectivul principal al prezentei invenții este reprezentat de obținerea unor produse
fitoterapice cu acțiuni complementare: estrogen-mimetică, de accelerare a turn-overului celular
3 și proteic, de remodelare a cicatrizării imperfecte, antioxidantă, antiinflamatoare față de radiația
UV, asociate în prevenirea și tratamentul îmbătrânirii și al proceselor conexe de degradare a
5 țesutului cutanat, prin asocierea originală, în proporții variabile a extractelor standardizate din
plante, și anume: 0,01...2% extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium* (pulbere
7 purificată cu un conținut 100% acizi triterpenici, format din minimum 80% acid ursolic și
maximum 20% acid oleanolic, hidroxiursolic, hidroxioleanolic, betulinic, dehidrobetulinic),
9 0,3...6% extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba* (standardizat în compuși flavonoidici
exprimați în rutin de minimum 1%, și în acizi polifenolcarboxilici exprimați în acid cafeic de
11 minimum 0,3%), 0,01...5% extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba* (standardizat în
agliconi triterpenici hidrolizați, exprimați în acid oleanolic de minimum 0,3% și în compuși
13 flavonoidici exprimați în rutin de minimum 0,15%), 0,05...3% extract uscat de saponine
triterpenice, din *Calendula officinalis herba* (pulbere galben-cafenie nehigroscopică, cu un
15 conținut de saponine triterpenice ale acidului oleanolic de 50...70%), 0,02...3% extract triter-
penic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba* (pulbere purificată cu un conținut 100%
17 acid oleanolic), 0,5...5% extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba* (standardizat
în compuși flavonoidici, exprimați în quercetină, de minimum 0,15 g/100 ml, și în agliconii
19 izoflavonici, de minimum 0,23 g/100 ml, ca sumă a daidzeinei, genisteinei, formononetinei și
biochaninei A), alături de extracte de *Arctium lappa*, *Corylus avellana* și *Centaurea cyanus*, și
21 de ingrediente cosmetice uzuale, de tipul: apă, glicerină, ulei din semințe de struguri, ulei de
măslină hidrogenat, ulei de jojoba, ulei din semințe de *Plukenetia Volubilis*, ulei de ricin hidro-
23 genat, trigliceride ale acizilor caprilic/capric, squalane, alantoină, alcool cetearilic, alcool cetilic,
alcool stearilic, stearat de polietilenglicol-100, stearat de gliceril, polisorbit 80, C10-30 alchil
25 acrilat reticulat, hidroxianisol butilat, acid stearic, hidroxid de sodiu, benzoat de alchil C12-15,
octocrilen, hidroxianisol butilat, acid etilendiamino-tetraacetic disodic, fenoxietanol, sorbat de
27 potasiu, bisabolol, parfum ș.a.

Exemplul 1. Crema dermorestitivă de zi

29 Formula de condiționare:

Tabel

Nr. crt.	Denumire substanțe	Cantitate (g)%
1	Apă purificată	Ad. 100
2	Ulei din semințe de struguri	5,00
3	Ulei de măslină hidrogenat	4,00
4	Ulei de jojoba	3,00
5	Glicerină	3,00
6	Ulei din semințe de <i>Plukenetia volubilis</i>	3,00
7	Trigliceride ale acizilor caprilic/capric	3,00
8	Squalane	3,00
9	Extract din tărațe de grâu	3,00
10	Stearat de gliceril și stearat de polietilenglicol-100	2,00
11	Alcool cetearilic	2,00
12	Alcool cetilic	2,00

Nr. crt.	Denumire substanțe	Cantitate (g)%	
13	Stearat de polietilenglicol -100	2,00	3
14	Fenoxietanol și sorbat de potasiu	0,60	
15	Extractul triterpenic fluid, din <i>Medicago sativa herba</i>	1,50	5
16	Extract flavonoidic fluid, din <i>Viola tricolor herba</i>	0,50	
17	C 10-30 alchil acrilat reticulat	0,30	7
18	Bisabolol	0,10	
19	Hidroxid de sodiu soluție 10%	q.s.	9
20	Parfum	0,10	
21	Extract triterpenic uscat, din <i>Salvia officinalis folium</i>	0,50	11
22	Hidroxianisol butilat	0,05	
23	Acid etilendiaminotetraacetic disodic	0,05	13

Prepararea produsului dermatocosmetic: 15

Se dizolvă într-un vas de omogenizare, la viteza de rotație de 1000...1300 rpm, timp de 60 min, la o temperatură cuprinsă între 60 și 65°C, ingredientele fazei 1: apă, acid etilendiaminotetraacetic disodic, glicerină, fenoxietanol și sorbat de potasiu. Se adaugă extract triterpenic fluid, din *Medicago Sativa Herba*, extract flavonoidic fluid, din *Viola Tricolor Herba*, și extract din tărâțe de grâu, și se continuă agitarea timp de 30 min, până la dizolvarea totală a acestora. În soluția obținută se adaugă C10-30 alchil acrilat reticulat, și se lasă la hidratat timp de 120 min. Se adaugă soluția de hidroxid de sodiu 10%, sub agitare, la temperatura cuprinsă între 60 și 65°C. Într-un alt vas de omogenizare se încălzesc ingredientele fazei 2: ulei din semințe de struguri, ulei de măsline hidrogenat, ulei de jojoba, ulei din semințe de *Plukenetia Volubilis*, trigliceride ale acizilor caprilic/capric, squalane, alcool cetearilic, alcool cetilic, stearat de polietilenglicol - 100, hidroxianisol butilat, stearat de gliceril și stearat de polietilenglicol - 100, și extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, la o temperatură cuprinsă între 60 și 65°C, sub agitare, iar după omogenizare se adaugă peste ingredientele fazei 1, și se continuă agitarea timp de 10 min, sub vid, menținând temperatura cuprinsă între 60 și 65°C. La sfârșitul procesului de omogenizare amestecul se răcește progresiv până la o temperatură de aproximativ 25°C, și se adaugă sub agitare bisabolol și parfum. 31

Exemplul 2. Crema anti-aging, recomandată persoanelor peste 45 de ani

Formula de condiționare: 33

Nr. crt.	Denumire substanțe	Cantitate (g) %	
1.	Cetearil glucosidă	1,00	37
2.	Stearat de gliceril	2,00	
3.	Alcool stearilic	1,00	39
4.	Acid stearic	1,50	
5.	Trigliceride ale acizilor caprilic/capric	3,00	41
6.	Bisabolol	0,10	

Nr. crt.	Denumire substanțe	Cantitate (g) %
7.	Extract izoflavonoidic fluid, din <i>Trifolium pratense herba</i>	2,50
8.	Extract flavonoidic fluid, din <i>Viola tricolor herba</i>	0,50
9.	Extract uscat de saponine triterpenice, din <i>Calendula officinalis herba</i>	0,30
10.	Glicerină	3,00
11.	Apă purificată	Ad.100
12.	Benzoat de alchil C12-15	3,00
13.	Gumă de xantan	1,00
14.	Hidroxid de sodiu soluție 10%	q.s.
15.	Octocrilen	2,80
16.	Parfum	0,10
17.	Fenoxietanol și sorbat de potasiu	0,60
18.	Acid etilendiaminotetraacetic disodic	0,05
19.	Hidroxianisol butilat	0,05

Prepararea produsului dermatocosmetic:

Se dizolvă într-un vas de omogenizare, sub agitare, timp de 60 min, la o temperatură cuprinsă între 60 și 65°C, ingredientele fazei 1: apă, acid etilendiaminotetra acetic disodic, cetearil glucozidă, glicerină, fenoxietanol și sorbat de potasiu, extract izoflavonoidic, din *Trifolium Pratense Herba*, extract flavonoidic fluid, din *Viola Tricolor Herba*, și extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*. În soluția obținută se adaugă guma de xantan și se lasă la hidratat timp de 120 min. Se adaugă, sub agitare, soluția de hidroxid de sodiu 10%, la temperatura cuprinsă între 60 și 65°C, obținându-se un gel ușor vâscos. Într-un alt vas de omogenizare se încălzesc ingredientele fazei 2: stearat de gliceril, alcool stearilic, acid stearic, trigliceride ale acizilor caprilic/capric, benzoat de alchil C12-15, octocrilen, hidroxianisol butilat, care se adaugă peste ingredientele fazei 1, sub agitare, timp de 10 min, menținând temperatura cuprinsă între 60 și 65°C. La sfârșitul procesului de omogenizare se începe răcirea progresivă până la o temperatură de aproximativ 25°C, apoi se adaugă sub agitare bisabolol și parfum.

Exemplul 3. Loțiune pentru îngrijirea tenului după ras

Formula de condiționare:

Nr. crt.	Denumire substanțe	Cantitate (g)%
1.	Apă purificată	Ad. 100
2.	Alcool etilic	3,00
3.	Glicerină	2,00
4.	Fenoxietanol și sorbat de potasiu	0,50
5.	Ulei de ricin hidrogenat	1,00
6.	Hidroxid de sodiu soluție 10%	QS.
7.	Polisorbat 80	0,30

RO 128802 B1

Tabel (continuare)

Nr. crt.	Denumire substanțe	Cantitate (g) %
8.	Parfum	0,50
9.	Alantoină	0,30
10.	Mentol	0,05
11.	Extract flavonoidic fluid, din <i>Viola tricolor herba</i>	1,00
12.	Extract izoflavonoidic fluid, din <i>Trifolium pratense herba</i>	1,00
13.	Extract uscat de saponine triterpenice, din <i>Calendula officinalis herba</i>	0,30
14.	Extract din <i>Arctium lappa radix</i>	3,50

Prepararea produsului dermatocosmetic:

Faza 1: Se dizolvă într-un vas mentolul în alcool etilic, sub agitare, timp de 20 min.

Faza 2: În alt vas se dizolvă în apă, sub agitare, timp de 60 min: alantoină, glicerină, extract din *Arctium lappa radix*, extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, extract izoflavonoidic, din *Trifolium pratense herba*, extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*.

Faza 3: Se amestecă uleiul de ricin hidrogenat cu polisorbitul 80 și fenoxietanol, sorbat de potasiu și parfum, timp de 20 min.

Se amestecă sub agitare componentele fazei 1, fazei 2 și fazei 3, timp de 30 min, la viteza de rotație de 500...600 rpm.

RO 128802 B1

Revendicări

1
3 1. Produs dermatocosmetic împotriva îmbătrânirii, cu efect regenerativ, restitativ,
5 modulator estrogenic, fotoprotector, **caracterizat prin aceea că** va consta din asocierea a 2...6
7 extracte vegetale în proporții de 0,01...2% extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*,
9 0,1...3% extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, 0,02...3% extract
11 triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, 0,5...5% extract izoflavonoidic fluid,
13 din *Trifolium pratense herba*, 0,01...5% extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*,
15 0,3...6% extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, condiționat sub formă de cremă, gel
sau loțiune.

11 2. Produs dermatocosmetic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** are în
13 compoziție 0,01... 0,5% extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, 0,5...1,5% extract
15 flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, și 1...5% extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa*
17 *herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale, condiționat sub formă de cremă dermorestitutivă
19 de zi.

17 3. Produs dermatocosmetic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** are în
19 compoziție 0,01...0,5% extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, 0,5...1,5% extract
21 uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și 1...5% extract flavonoidic fluid,
23 din *Viola tricolor herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale, condiționat sub formă de cremă
25 dermorestitutivă de noapte.

21 4. Produs dermatocosmetic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** are în
23 compoziție 0,5...5% extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, 0,05...1,5% extract
25 uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și 0,5...5% extract flavonoidic
fluid, din *Viola tricolor herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale, condiționat sub formă de
gel sau loțiune de îngrijire a tenului după ras.

27 5. Produs dermatocosmetic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** are în
29 compoziție 0,02...2% extract triterpenic hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, și 1...6%
extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale,
condiționat sub formă de loțiune pentru protecție solară.

31 6. Produs dermatocosmetic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** are în
33 compoziție 0,5...3% extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, 0,05...1,5% extract
35 uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și 0,3...1% extract flavonoidic
37 fluid, din *Viola tricolor herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale, condiționat sub formă de
39 cremă anti-aging, recomandat persoanelor peste 45 de ani.

35 7. Produs dermatocosmetic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** are în
37 compoziție 0,1...3% extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*,
39 0,5...4% extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, și 0,1...3% extract triterpenic
hidrolizat uscat, din *Calendula officinalis herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale,
condiționat sub formă de cremă de mâini, cu efect reparativ.

41 8. Produs dermatocosmetic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** are în
43 compoziție 1...5% extract izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, 0,1...1% extract
45 uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, și 0,01...3% extract triterpenic
fluid, din *Medicago sativa herba*, alături de extracte de *Arctium lappa*, *Corylus avellana* și
Centaurea cyanus, și de ingrediente cosmetice uzuale, condiționat sub formă de cremă și
loțiune antiacneică.

RO 128802 B1

9. Produs dermatocosmetic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** are în compoziție 1...4% extractul izoflavonoidic fluid, din *Trifolium pratense herba*, 0,05...2% extract triterpenic uscat, din *Salvia officinalis folium*, 0,1...1% extract uscat de saponine triterpenice, din *Calendula officinalis herba*, 0,3...1% extract flavonoidic fluid, din *Viola tricolor herba*, și 1...5% extract triterpenic fluid, din *Medicago sativa herba*, alături de ingrediente cosmetice uzuale, condiționat sub formă de cremă de remodelare cutanată post-traumatică. 1
3
5
10. Produs dermatocosmetic, definit în revendicările 2...5, **caracterizat prin aceea că** este utilizat pentru prevenirea și terapia anti-îmbătrânire, fotoprotectoare. 7
11. Produs dermatocosmetic, definit în revendicările 6...8, **caracterizat prin aceea că** este utilizat în procesele de regenerare epidermală și remodelare dermică. 9
12. Produs dermatocosmetic, definit în revendicarea 9, **caracterizat prin aceea că** este utilizat în prevenirea cicatricelor inestetice și favorizarea vindecării rănilor minore de diferite etiologii: arsuri solare, mici traumatisme, leziuni cutanate etc. 11
13



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 328/2017