



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00482

(22) Data de depozit: 29.06.2012

(41) Data publicării cererii:
30.10.2013 BOPI nr. 10/2013

(71) Solicitant:
• BIOTEHNS 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;

• 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

(54) **PROCEDEU ECOLOGIC DE VALORIFICARE OPTIMĂ A
POTENȚIALULUI DE SUBSTANȚE BIOLOGIC ACTIVE AL
PLANTEI *TRIGONELLA FOENUM GRAECUM* ȘI PRODUSELE
COSMETICE CU ACȚIUNE ESTROGEN MIMETICĂ
REALIZATE**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de valorificare optimă a potențialului de substanțe biologic active al plantei *Trigonella foenum graecum* (schinduf), cu obținerea de produse fitoterapeutice dermatocosmetice, cu acțiune estrogen mimetică. Procedeu constă în supunerea semințelor uscate și măcinate de *Trigonella foenum graecum* unei proceduri de extracție în patru etape succesive, fiecare în trei trepte, cu patru solvenți diferiți, și anume, o primă extracție cu acetona, o a doua extracție a materialului rămas cu alcool etilic 80...96%, o a treia extracție cu soluție hidroalcoolică 40...70% și, în final, o a patra extracție a materialului cu apă purificată încălzită la 30...60°C, materialul rezidual

epuizat fiind reciclat în final drept compost. Extractele fitoterapice obținute din fiecare etapă de extracție au fost prelucrate și purificate, rezultând preparate conținând ulei de schinduf, extract standardizat în saponine steroidice și flavonoide sau numai saponine steroidice, diosgenină și complex bioactiv polizaharidic. Preparatele fitoterapice au fost condiționate în diverse forme dermatocosmetice, pentru utilizare în terapia țesutului cutanat îmbătrânit, sau în terapia formațiunilor acneice.

Revendicări: 8

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



PROCEDEU ECOLOGIC DE VALORIFICARE OPTIMA A POTENTIALULUI DE SUBSTANTE BIOLOGIC ACTIVE al PLANTEI *TRIGONELLA FOENUM GRAECUM* SI PRODUSELE COSMETICE CU ACTIUNE ESTROGEN MIMETICA REALIZATE

Prezenta inventie se refera la un procedeu ecologic aplicabil la scara industrială prin care se valorifica integral componentele biologice active ale plantei *Trigonella foenum graecum*. Aceasta presupune cultivarea plantei in sistem ecologic, obtinerea materiei prime vegetale necesare extractiei selective in trepte, separarea componentelor farmaceutice si cosmetice active cu reciclarea materiilor vegetale si a resurselor utilizate, precum si conditionarea acestora in produse cosmetice cu actiune estrogen mimetica.

Produsii cosmetici activi obtinuti conform inventiei sunt:

- **compus lipofil**, sub forma unui lichid galben, usor opalescent cu un continut standardizat in acizi grasi mono si polinesaturati ω -3 si ω -6 componenti ai vitaminei F de min.80%, denumit U1, obtinut in cantitate de 3-5 g/100 g materie prima uscata;

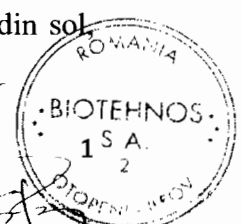
- **extract selectiv** conditionat fie in glicerina, propilenglicol, sau butilenglicol sub forma unui lichid brun roscat limpede, cu miros caracteristic, standardizat in saponine steroidice totale de min.1% si compusi flavonoidici de min.0,15g/100 mL, denumit (SKs2), obtinut in raport 1:1-3:1 materie prima vegetala:extract; sau sub forma de pulbere portocalie, cu un continut in saponine steroidice totale de min.8% si compusi flavonoidici de min.1,0 g/100 g obtinut in cantitate de min.8 g/100 g seminte de schinduf, denumit Ps2;

- **extract selectiv** conditionat fie in glicerina, propilenglicol, sau butilenglicol standardizat in agliconi steroidici totali 0,2-0,3% din care diosgenina 0,1-0,15% si in compusi polifenolici exprimati in acid cafeic de 0,15-0,2% obtinut in raport 1:1-3:1 materie prima vegetala:extract, denumit Ska3; fie compus steroidic brut, sub forma de pulbere cafenie, cu un continut in aglicon steroidic total de 8-10% obtinut in cantitate de minim 2 g/100 g materie prima denumit Pa3, din care prin operatii succesive de purificare se obtine produsul purificat cu un continut in diosgenina cuprins intre 60-90%;

- **complex bioactiv polizaharidic** cu structura de galactomanani, sub forma unei pulberi fine, gri-cafenii, cu un continut standardizat in fibre solubile in apa de min.85%, obtinut in cantitate de minim 20 g/100 g materie prima, denumit PP4;

- **ingrasamant verde**, constituit din materia prima din care au fost extrase componentele cosmetice active, ce se recicleaza sub forma de compost prin incorporarea in aratura din sol obtinut in cantitate de maxim 60 g/100 g materie prima.

Alb
B...
...



Brevetul prezinta de asemenea si variantele de conditionare ale componentelor active, sub forma de produse cosmetice dezvoltate pe baza proprietatilor estrogen mimetice, antiinflamatoare, antimicrobiene, fotoprotectoare fata de radiatia UV_A si UV_B, sustinute de studiile de actiune specifica „in vitro” realizate pe linii celulare standardizate: HaCaT (keratinocit uman normal), HS 27 (fibroblast dermic uman normal), HUVEC (endotelium vascular).

Conform prezentului brevet, obtinerea culturilor de plante medicinale se realizeaza in sistem ecologic si/sau alternativ, iar tehnologiile de extractie a componentelor /ingredientilor cosmetici presupun consumuri energetice minime si randamente optime, conform principiilor tehnologiilor ”prietenoase cu mediul”.

Culturile agricole ecologice reprezinta solutia pentru rezolvarea problemelor legate de satisfacerea cererii tot mai crescute pentru produsele naturale, ce nu presupun folosirea substantelor chimice de sinteza. Lipsa pesticidelor remanente in planta utilizata ca sursa de materii prime este un deziderat al industriei farmaceutice si cosmetice, in special datorita utilizarilor terapeutice ale fitocompusilor.

In tehnologia de cultivare a skindufului metodele de pregatire a terenului, de infiintare si intretinere, de combatere a bolilor si daunatorilor, precum si recoltarea s-au realizat in conformitate cu principiile de agricultura ecologica, avand caracter de noutate pentru tara noastra. Agricultura ecologica urmareste atat protectia mediului inconjurator, mentinerea si cresterea fertilitatii solului precum si reciclarea resurselor, in special vegetale cat mai mult in interiorul exploatarilor agricole. Astfel, cresterea fertilitatii solului se poate realiza fie prin introducerea culturilor alternative, fie prin reciclarea si folosirea ingrasamantului verde. Sistemele de culturi alternative pe langa faptul ca imbunatatesc structura si fertilitatea solului datorita capacitatii de a fixa azotul pot reduce si atacul bolilor si daunatorilor. Un alt aspect inovativ il constituie introducerea unor elemente tehnologice noi ca distanta intre randuri care s-a modificat de la 62.5cm. la 37.5 cm., precum si reducerea normei de samanta la unitatea de suprafata de la 18 – 20kg/ha folosita in sistemul conventional la 12 – 14 kg/ha.

Printre plantele agricole alternative ce se preteaza cel mai bine conditiilor pedoclimatice din Romania pentru rotatia culturilor si fixarea azotului organic se numara *Trifolium pratense*, *Trigonella foenum graecum*, *Sinapis alba*.

Conform prezentei inventii, cultivarea plantei *Trigonella foenum graecum*-schinduful, va aduce beneficii:

- solului, prin fertilizarea ecologica;



Handwritten signatures and initials at the bottom of the page, including a large signature on the left and several smaller ones on the right.

- animalelor: prin valorificarea plantei uscate obtinuta dupa recoltarea semintelor, ca furaj foarte valoros pentru animale, prin stimularea masei musculare;
- oamenilor: prin utilizarea semintelor drept materie prima in tehnologia de extractie si separare a componentelor terapeutice si/sau cosmetice active;
- mediului: prin reciclarea materialului vegetal extras-rezidual sub forma de compost, ca ingrasamant verde, prin incorporarea acestuia in aratura din sol.

Tehnologia la nivel industrial de obtinere a componentelor terapeutice si/sau cosmetice active, propusa conform inventiei presupune cateva avantaje:

- instalatia de extractie este simpla dar foarte eficienta fiind alcatuita din vase de extractie si rezervor din inox- pentru solvent si solutiile extractive- intre care s-a montat o bucla de recirculare a solventului/miscelei in care sunt amplasate 2 pompe centrifuge a caror viteza mare 2900 rpm imprima o capacitate mare de extractie a componentelor din planta;
- extractia selectiva ce utilizeaza un sistem de extractie in trepte cu solventi nepolari pana la polari, epuizeaza materia prima de metaboliti valorosi;
- fiind o tehnologie ecologica, evita temperaturile de prelucrare mari, ceea ce nu presupune consumuri energetice mari ;
- etapele de extractie se realizeaza la temperatura ambianta ;
- intregul proces evita valorile de pH extreme realizandu-se de obicei la valorile obisnuite ale solventilor;
- timpul de extractie este mult redus datorita vitezei mari de recirculare a solventului/miscelei;
- etapele de concentrare se realizeaza sub vid, marind astfel capacitatea de distilare si reducand timpul operatiilor;
- componentele active obtinute ce reprezinta ingrediente cosmetice sunt conditionate in diferite produse cosmetice de ingrijire a pielii de tip anti-aging si anti-acneic. Eficacitatea acestora se bazeaza pe actiunea de tip estrogen mimetica, dermo-restitutiva, fotoprotectoare si antimicrobiana la nivel de celula tinta, confirmata de studii clinice pe voluntari umani.

In functie de mecanismele implicate, imbatranirea pielii poate fi intrinseca (cronologica) si extrinseca (foto-imbatranirea). **Imbatranirea cronologica este** caracterizata prin: scaderea turn-over-ului celular al fibroblastilor dermici, a sintezei proteinelor din matrixul extracelular, depletie de estrogeni, cu consecinte asupra ratei de proliferare celulara si a producerii colagenului, epiderm mai subtire, cu o rata proliferativa a keratinocitelor diminuatata fata de normal. **Foto-imbatranirea este** caracterizata prin: cresterea numarului fibroblastilor hiperplastici, capacitate redusa de sinteza a colagenului, acumulari de fibre dense de elastina si colagen, cu structura dezorganizata, ca rezultat al cicatrizarii deficitare in

[Handwritten signatures and stamps]

BIOTEHNOS
3S A.
2

urma leziunilor produse de radiatia UV, rata proliferativa a keratinocitelor mai mare decat cea normala, epiderm ingrosat, prezenta inflamatiei.

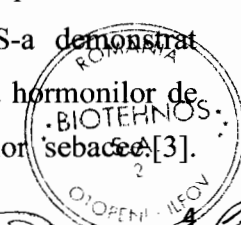
Imbatranirea intrinseca este inevitabila fiind un proces programat genetic, pe cand imbatranirea extrinseca este determinata de diferiti factori :vantul, caldura, fumul de tigara, chimicalele iar radiatiile UV reprezinta cel mai important factor.

Modificarile semnificative suportate de piele in timpul menopauzei reprezinta manifestarea dereglarilor suferite de componentele individuale ale acesteia. Estrogenii regleaza diverse functii celulare, printre care proliferarea, morfogeneza, diferentierea si apoptoza. Caile de semnalizare prin care estrogenii influenteaza functiile celulare sunt complexe, implicand receptori intracelulari (nucleari sau membranari) care intervin in reglarea transcrierii unor gene.[1] Metabolismul celular este influentat de starea de hipoestrogenism din timpul menopauzei, ce determina modificari in continutul de colagen, alterari ale concentratiei de glucozaminoglicani si cel mai important in continutul de apa. [2] Aceste modificari altereaza functiile pielii determinand imbatranirea acesteia, scaderea cantitatii de colagen deci diminuarea elasticitatii si fermitatii, reducerea cantitatii de glucozaminoglicani hidrofilii deci scaderea continutului de apa ce influenteaza hidratarea.

De asemenea, scaderea productiei de sebum ce reprezinta un film protector efectiv ce diminueaza pierderile de apa la menopauza, este un factor ce contribuie la neplacerile legate de pielea uscata si rugoasa.

Ca actiuni pentru remodelarea tesutului cutanat imbatranit au fost urmarite urmatoarele efecte: Actiune „estrogen-like”, cresterea turn-overului celular si a sintezei de colagen – **pentru imbatranirea cronologica**; Indepartarea proteinelor degradate (activarea metaloproteinazelor - MMP), accelerarea sintezei proteice, reconstructia microvasculaturii dermice afectate de radiatia UV, efect anti-inflamator si foto-protector – **pentru foto-imbatranire; efect antioxidant, accelerarea metabolismului celular** (sinteza de ATP), **regenerare epidermala** – pentru ambele tipuri de proces.

Acneea este o boala inflamatorie cronica a glandelor pilosebacee, caracterizata prin macule, papule, pustule si uneori nodule, chisturi si cicatrici. Principalii factori implicati in patogeniza acneei sunt:cresterea productiei de sebum, perturbarea homeostaziei microflorei bacteriene locale, cornificarea aparatului pilosebaceu si inflamatia. Pielea si in mod special unitatea pilosebacee poate fi considerate un organ endocrin, fiind atat tinta pentru diferiti hormoni, exprimand receptori specifici, cat si sediu al sintezei altora. S-a demonstrat implicarea hormonilor steroizi, retinoizi, a liganzilor receptorilor nuclear si a hormonilor de stress in controlul dezvoltarii unitatilor pilosebacee, in lipogeneza glandelor sebacee[3].



Handwritten signatures and initials at the bottom of the page.

Supraproductia de hormoni androgeni si nivelul scazut de estrogeni sta la baza declansarii acneei, a alopeciei androgenice si a seboreei. „Hiperandrogenismul cutanat” este cauzat de supraexpresia „in situ” a enzimelor androgene si a hiper-responsivitatii receptorilor androgeni. [4]

Pornind de la datele oferite de fitoterapiile traditionale, utilizarea agentilor de chemopreventie de origine vegetala ce inhiba aceste transformari au devenit de interes atat in industria suplimentelor nutritive cat si in cea cosmetica.

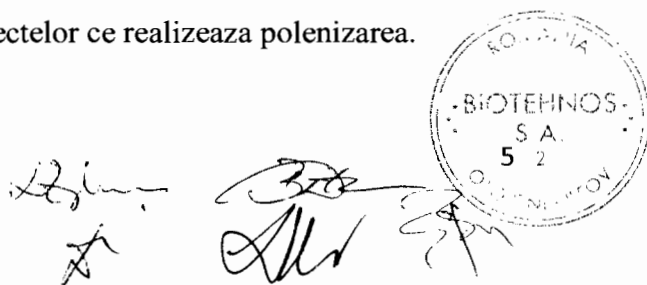
Astfel, Panax ginseng ce activeaza metabolismul pielii si fluxul sanguin, reduce keratinizarea, hidrateaza si catifeleaza atenuand ridurile si sporind luminozitatea pielii. Ceaiul verde si cel negru ce contine catehine neutralizeaza actiunea radicalilor liberi. Extractul de vitis vinifera ce contine procianidine cu activitate puternic antioxidanta si antidegenerativa se utilizeaza drept agent de albire. O varietate larga de compusi, majoritatea sub forma de suplimente alimentare au fost studiate pentru efectele lor fotoprotectoare la nivelul pielii. [5]

Efectul pozitiv al hormonilor asupra pielii este bine cunoscut. Productia de hormoni in organismul uman scade cu varsta, determinand astfel imbatranirea pielii. Colagenul de la nivelul pielii scade, astfel este diminuata abilitatea acesteia de a retine apa. Pielea se usuca, se subtiaza, apar semnele vizibile ale imbatranirii. Relativul hipoestrogenism ce acompaniaza menopauza exacerbeaza efectele atat intrinsece cat si de mediu ale imbatranirii. Estrogenii intervin in biosinteza colagenului si in grosimea dermei prin consolidarea matrixului extracelular, in capacitatea de hidratare a stratului corneum prin sinteza de glicozaminoglicani care retin moleculele de apa, in variatiile de pigmentare si in inducerea ridurilor.

Utilizarea ingredientilor vegetali a luat amploare, acestia putand fi clasificati in extracte totale cum sunt: gelul de aloe vera, ceaiurile, tincturile; extractele selective- de lemn dulce, ginkgo biloba, germeni de grau si substantele purificate- vitaminele, coenzima Q10 [6]

Astfel, pentru a reduce pierderea apei transepidermale se aplica un film protector, de tipul uleiului de mango, de cocos, de floarea- soarelui, masline sau unt de cacao. Pentru eczeme sau dermatita topica se foloseste pudra de cucurma. Acneea ce afecteaza glandele sudoripare si foliculii parului se trateaza cu decoct din Artemisia vulgaris, ulei de Basilicum cu actiune antibacteriana, ulei si infuzii de Cucurbita pepo, suc de Allium cepa.

Plantele produc o vasta si diversa gama de compusi organici, din care majoritatea nu pare ca ar participa in mod direct la cresterea si dezvoltarea acestora. Functia biologica a acestor metaboliti secundari este in mare parte necunoscuta, lor li se atribuie functia de protectie fata de ierbivore, infectii microbiene, sau de atragere a insectelor ce realizeaza polenizarea.



Interesul economic fata de acesti produsi naturali obtinuti din plante este din ce in ce mai crescut, mai ales datorita cerintelor acestora in diferite tipuri de industrii: farmaceutica, cosmetica, alimentara.

Majoritatea ingredientilor cosmetici vegetali sunt utilizati conform traditiei, fara sa fie sustinuti de studii stiintifice de eficienta si siguranta.

Mult utilizati drept ingrediente cosmetici, sub forma de extracte din plante datorita proprietatilor de detergenti, sunt saponinele triterpenice sau steroidice, care datorita distributiei asimetrice: aglicon hidrofob si lant zaharic hidrofil, prezinta caracter amfipatic ce determina proprietatea acestora de a forma spuma si a reduce tensiunea de suprafata.

Beneficiile acestora pentru om se refera la utilizarea in industria detergentilor, industria farmaceutica datorita posibilitatii de a forma complexe cu colesterolul deci ca agenti hipolipemianti; agenti antiinflamatori; fiind precursori chimici ai hormonilor steroidici, ai cortizonului, vitaminei D, glicozizilor cardiotonici, drept materie prima in sinteza acestora; Saponinele steroidice insotesc de multe ori glicozizii cardiotonici. Primele saponine steroidice cercetate au fost cele din diferite specii de Digitalis, dar ele se gasesc si in ovaz, ardei iute, vinete, seminte de tomate, ceapa, sparanghel, schinduf, yucca, ginseng, yam.

În continuare sunt prezentate brevetele de invenție și cererile de brevet de invenție ce revendica aplicatiile terapeutice ale unor compuși steroidici obtinuti din diferite surse vegetale.

-Brevetul WO 00/30603 propune ca ingredient activ agliconul saponinei steroidice obtinut din Dioscorea tokoro-diosgenina ca agent de subtiere datorita actiunii asupra adipocitelor iar brevetul DE-198 41 795 propune utilizarea diosgeninei ca inhibitor de colagenaza si agent anti-microbian, in tratarea diferitelor afectiuni cu componenta infectioasa, inclusiv dermatita seboreica si acnee. De asemenea s-a raportat si proprietatea acesteia, de a inhiba activitatea enzimei 12-lipoxigenaza.[7]

- Hecogenina si tigogenina steroide obtinute din Agave americana se pare ca poseda activitate anti-inflamatoare[8]

Imbatranirea cutanata poate fi tratata conform brevetelor U.S. 200220028186; U.S. 6,331,535; FR-2 811 561; FR-2 811 567 cu diferite compozitii ce includ saponinene, inclusiv diosgenina . Saponinele steroidice din Avena, avenacozida A si B cu aglicon nuatigenina, poseda proprietati amfotere cu abilitatea de a se co-solubiliza atat in faza apoasa cat si in cea uleioasa. De asemenea aceste saponine prezinta proprietati antifungice.

[Handwritten signatures and a circular stamp]

Stamp: ROMANIA BIOTEHNOS S.A. 2 6

- Cererea de brevet de inventie U.S. 20030235599 relateaza despre o compozitie ce contine sapogenine, potrivita utilizarii aplicatiilor topice pentru catifelarea si netezirea ridurilor si a liniilor fine.

- Pentru a preveni semnele de imbatranire, Liviero, in cererea de brevet de inventie U.S. 2003152597 propune un extract natural ce contine sapogenine, cu efecte asupra elasticitatii si tonicitatii pielii, formarii ridurilor si liniilor fine ce actioneaza prin inhibarea colagenazelor.

- Cererea de brevet de inventie U.S.20030211185 propune utilizarea saponinelor spirostanolice din Tribulus terrestris, pentru tratarea infectiilor bacteriene, fungice si virale in particular a celor din sfera genituala.

- Suplimente nutritive ce contin extracte din Dioscorea villosa pot fi consumate pentru probleme legate de climacteriu.[9] Extractele contin cantitati importante de diosgenina iar cercetarile au fost efectuate in vitro pentru efectul acesteia fata de piele. In vitro, diosgenina determina cresterea sintezei DNA-ului iar pe keratinocite umane s-a evidentiat cresterea continutului in brom-deoxiuridina si a AMP-ului ciclic. Administrarea in vivo a diosgeninei, imbunatateste finetea pielii la soarecii ovariectomizati fara sa altereze gradul de acumulare al grasimii. Pentru a determina siguranta administrarii, au fost supuse testarii diosgenina si 17 beta-estradiolul. In timp ce 17 beta-estradiolul accelereaza cresterea tumorii, diosgenina nu prezinta acest efect secundar. Rezultatele cercetarilor evidentiaza efectul de restaurare al proliferarii keratinocitelor la nivelul pielii imbatranite, sugerand astfel ca diosgenina are un potential important ca supliment nutritiv.

Un extract bogat in saponine spirostanolice obtinut din Tribulus terrestris brevetat de Alexis si colab. US 6,607,765 este utilizat in terapeutica pentru tratarea diferitelor infectii bacteriene, fungice, virale, in special din zona ginecologica.

- Liviero, in cererea de brevet US 20030152597, revendica un extract natural ce contine sapogenine, pentru prevenirea aparitiei semnelor imbatranirii pielii, in principal pierderea elasticitatii si/sau a tonicitatii, sau formarea ridurilor prin efect de inhibare a colagenazelor.

Walsh si colab. in brevetul US 5,505,502, revendica utilizarea unui extract obtinut din ienupar, cu un efect de subtiere a secretiilor grase, imbunatatind simptomele legate de acnee, dar structura chimica implicata evidentiaza prezenta polizaharidelor acide, de tip pectinic.

- Ong si colab.in brevetul US 6,905,714 revendica un preparat obtinut din planta Eucommia ulmoides, utilizat in modularea metabolismului hormonilor steroizi androgeni- de exemplu cei legati de dezvoltarea sexuala primara, de procesele anabolice, de efectele asupra pielii, de cresterea parului precum si de metabolismul lipidic.

Handwritten signatures and a circular stamp:
A circular stamp with the text "BIOTEHINOS" and "S.A." is visible, along with several handwritten signatures and initials.

- Conform brevetului JP 2003300862, Rubisntenn revendica o compozitie ce contine saponenine, dintre care enumera diosgenina si hecogenina sau un extract de plante pentru tratarea pielii uscate hiposeboreice sau a scalpului uscat.

- Mai Heinz in brevetul EP 1900356 (A1)-2008-03-19, revendica utilizarea unui extract obtinut din seminte de schinduf, caracterizat prin aceea ca este vorba de un amestec de saponine si/sau saponenine in concentratie de cel putin 8% cu utilizari farmaceutice, alimentare sau ca suplimente. Preparatul obtinut sub forma de capsule sau tablete contine 100-200 mg extract de schinduf/capsula si este destinat stimulării sau revitalizării epidermei, a parului, unghiilor, prevenirii formării matreții.

- Brevetul FR 2819409 revendica utilizarea diosgeninei obtinuta din orice sursa de Dioscorea prin sinteza, extractie, biotehnologie, inginerie genetica, singura sau in combinatie cu alte plante, in dermatocosmetica, in special pentru tratarea celulitei.

Park Deok Hoon in brevetul WO 2009088109 (A1)-2009-07-16 revendica o compozitie de albire a pielii ce contine diosgenina obtinuta din oricare sursa de Dioscorea (japonica, tokoro, septemloba) si alternativ se poate folosi si diosgenina comerciala livrata de firma Sabinsa.

-Gupta si colab propun o compozitie cosmetica si farmaceutica de inhibare a matricei metaloproteinazelor prin brevetul US 20060074108 (A1)-April 6,2006, in care pentru imbunatatirea circulatiei introduc diferite extracte de plante printre care si schinduful ce contine diosgenina. Nu se specifica o concentratie sau o compozitie chimica a extractului.

-O formula cosmetica brevetata prin DE 102005057292 (A1)-2007-06-06 , destinata ingrijirii unghiilor, parului, pielii contine un extract de schinduf cu un continut in diosgenina de minim 0,03 g/100 mL, iar in produsul final de 0,00015-0,003%. Produsul poate avea si aplicatii farmaceutice si atunci continutul in extract de schinduf creste la 1,75-2,25%.

Utilizarea la scara industriala a saponinelor este limitata in primul rand de pretul de cost.

Majoritatea procedeelor de extractie a saponinelor steroidice folosesc drept materie prima plante ce se cultiva mai putin in tara noastra ca de exemplu : Tribulus terrestris, diferite specii de Dioscorea. si seminte de Trigonella foenum graecum.

Tribulus terrestris este o planta cultivata in SUA, Asia si Mexic. Se utilizeaza in medicina traditionala din aceste spatii geografice pentru efectele asupra cresterii si dezvoltarii musculaturii, a potentiei datorita stimulării nivelului testosteronului.

Dioscorea deltoides este cultivata in Asia si este utilizata traditional pentru tratarea astmului si cresterea nivelului de testosteron.



Avena sativa, ovazul reprezinta o alta sursa de materie prima ce contine saponine steroidice, in cantitati totusi reduse pentru valorificarea industriala. Saponina steroidica identificata este avenacozida – de tip furostanolic.

Trigonella foenum graecum-schinduful este o planta cultivata in sudul Europei, in zona Mediteranei si in vestul Asiei.

In Romania, zonele favorabile pentru cultivarea schindufului sunt cele din S-E tarii (judetele Braila si Constanta). Este singura materie prima vegetala ce poate fi exploatata la nivel industrial pentru obtinerea agliconilor steroidici, din zona noastra geografica.

In Monografia ESCOP ed.II-pag.511,compozitia chimica a semintelor de schinduf evidentiaza ca si componente principale saponinele steroidice in principal furostanolice, care prin hidroliza elibereaza agliconii steroidici spirostanolici, in cantitate de 0,6-1,7% din care in principal diosgenina si epimerul lui yamogenina, in raport 3:2 impreuna cu tigogenina si alti agliconi.

Continutul in substante lipidice al semintelor de schinduf este evaluat la un procent cuprins intre 5-10%.

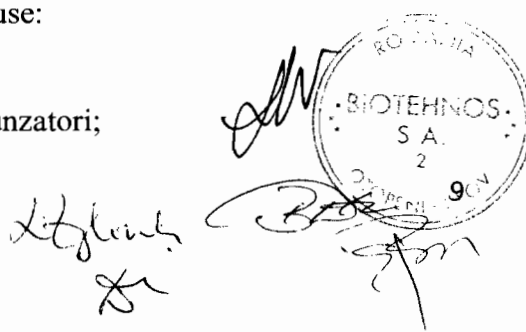
Un procent destul de ridicat 25-45% in compozitia semintelor de schinduf o reprezinta mucopolizaharidele, in principal galactomanani. Alti constituinti importanti sunt trigonellina-un alcaloid piridinic si aminoacizi liberi-4 hidroxiizoleucina.

Conform monografiei, indicatiile terapeutice ale plantei se refera la utilizarea ca adjuvant in terapia diabetului, anorexie, hipercolesterolemie moderata, iar pentru uz extern, in tratarea furunculozei, a ulcerelor si eczemelor, ca emolient prin aplicarea cataplasmelor obtinute prin fierberea semintelor in apa.

Schinduful este o planta valoroasa atat medicinala cat si alimentara. In tarile mediteraneene, in alimentatie se folosesc frunzele, iar semintele se adauga in diferite preparate de orez ca si condiment in Iran, in branzeturi in Elvetia, in bitter in Germania, in Egipt in paine, colorant alimentar si condiment in curry, inlocuitor de cafea in Africa dar si ca insecticid si agent de parfumare.

Conform brevetului de fata, datorita compozitiei chimice bogate, schinduful poate reprezenta o sursa de:

- Nutret pentru vite;
- Materie prima in industria cosmetica, farmaceutica, a suplimentelor alimentare sau alimentare, prin obtinerea unei game largi de produse:
 - o Ulei si/sau Oleorezine ;
 - o Saponine steroidice si/sau agliconii corespunzatori;



- o Fibre solubile de tipul galactomananilor;
- Sursa de azot biologic sub forma de ingrasamant verde.

Se cunosc o serie de brevete de inventie ce vizeaza valorificarea componentelor bioactive din schinduf dar acestea fie se refera numai la unul sau cel mult doua clase de substante si anume ulei si oleorezine ce includ si saponinele, fibrele solubile si/sau insolubile - mucopolizaharide de tipul galactomananilor, fie la utilizarea/ includerea extractului de schinduf- caracterizat prin continutul de 4-hidroxiizoleucina- in diferite compozitii cosmetice.

Astfel, brevetul US 6013289 (A)-2001-01-11 propune obtinerea unei compozitii de parfumare din semintele de schinduf, prin operatia de hidroliza la temperatura ridicata pentru inactivarea enzimelor, separarea prin centrifugare a hidrolizatului, separarea in faza lichida, evaporarea, concentrarea si uscarea produsului, utilizat in alimentatie. Nu se specifica continutul sau analiza chimica a acestei compozitii de parfumare.

O metoda de extractie a saponinelor steroidice din schinduf brevetata in CN 1170599 (A)-1998-01-21, in care dupa extractia cleiului, semintele sunt supuse extractiei cu gazolina, si apoi hidrolizei pentru obtinerea unui produs medicinal ieftin in comparatie cu cel obtinut din Dioscoreea. Nu se specifica compozitia chimica si nici randamentele obtinute pentru produsul obtinut.

-Brevetul RU 2192271 (C1)-2002-11-10, prezinta o metoda de obtinere a unui agent cardiotropic sub forma unui preparat lichid din seminte de schinduf, prin extractie cu alcool etilic 95%, in raport 1:1 , la temperatura 18-20 grade Celsius, timp de 144 ore, in 6 difuzoare. Produsul nu este caracterizat chimic, nefiind specificata compozitia si randamentul de obtinere al produsului.

-Brevetul WO 0174371 (A1)-2001-10-11 prezinta aplicatiile farmaceutice ale unui produs obtinut din mucilagii de tip galactomanani din semintele de schinduf. Mucilagiile se prezinta sub forma unei faini, cu un continut in oze de 60%, dintre care 50-55% sunt galactomanani si maxim 5% proteine.

-Brevetul US 20100129296-05.27.2010 revendica un procedeu de obtinere a unui extract apos obtinut din seminte de schinduf folosit ca dezinfectant, agent de conservare sau pentru tratarea herpesului, a acneei, a dermatitelor, rani infectate, periodontite. Procedeu implică etapa de umectare a semintelor in apa timp de 3- 24 ore, fierberea timp de 30 minute si conservarea prin inghetare. Pentru purificare se aplica cromatografia cu faza inversa si elutia cu un amestec de acetonitril/apa. Nu se prezinta compozitia chimica si randamentul de obtinere.

-In brevetul CN 1456570 (A)-2003-11-19 se prezinta o metoda de obtinere a saponinelor din semintele de schinduf ce presupune etapele de dezmuclaginare, dezlipidizare, pulverizare si

Handwritten signatures and a circular stamp.
The stamp contains the text: "BIOTEHNOS. SA 10" and other illegible markings.

extrarcia apoasa, la o temperatura cuprinsa intre 40-80 grade Celsius, timp de 20-40 ore. Purificarea se realizeaza pe rasini macropore, obtinandu-se un randament de 0,8-15%. Procedul presupune extractia doar a saponinelor,dezavantajul fiind ca celelalte componente raman in planta, neextrase.


Procedul de extractie al saponinelor si sapogeninelor conform brevetului francez FR 1496965 (A)-1967-10-06 presupune etapa de imbibare a semintelor de schinduf in apa de robinet la 37 grade Celsius, timp de 2 zile, urmata de hidroliza in mediu de HCl 2N, la reflux, timp de 2 ore, racirea, filtrarea, neutralizarea cu solutie amoniac si uscarea precipitatului obtinut in curent de aer cald. Dintr-un kg materie prima se obtin 400 g precipitat pulbere ce se purifica prin macerare repetata in percolator, cu eter de petrol. Extractul obtinut se supune concentrarii cand se obtin 2 fractii: 5 g pulbere denumita diosgenina bruta si 39 g faza uleioasa. Produsele astfel obtinute nu sunt caracterizate chimic.

-Tournay Alain in brevetul FR 2867686 (A1)-2005-09-23 propune un procedeu de obtinere a unui ulei din semintele de schinduf cu utilizari cosmetice sau alimentare, ambalat in flacoane sau sub forma de capsule, pentru proprietatile antioxidante, ca agenti tensioactivi, pentru tratarea uscaciunii cutanate, scaderea colesterolului. Procedul consta in extractia la rece sau la cald, cu hexan sau cu fluide supercritice, sub presiune, la cald la 20-60 grade Celsius sau la temperatura mai ridicata 60-80 grade Celsius, cand se obtine o cantitate de 1-5 % ulei. Extractia cu CO2 supercritic determina obtinerea a 6-10% ulei.

Compozitia uleiului evidentiaza un procent > 64% de acizi grasi polinesaturati dintre care Omega 6- 40,6% si Omega 3-25,3% , steroli > 1%, tocoferoli >0,5%.Procedul se refera la obtinerea doar a uleiului purificat din seminte de schinduf, nu se fac referiri legate de celelalte componente active din materia prima.

-Pentru imbunatatirea metabolismului glucidic, in tratarea probelelor legate de diabet, brevetul WO 2009136219 (A1)-2009-11-12 propune o compozitie pe baza de galactomanani obtinuta din semintele de schinduf. Procedul consta in extractia timp de 3-12 ore cu un solvent hidrocarbonat alifatic si un hidroalcool, la temperatura 30-40 grade Celsius, concentrarea solutiei obtinute, purificarea pe rasini schimbatoare de ioni pentru indepartarea bazelor azotate si ionice, trecerea pe o coloana adsorbanta ce retine substanta activa, pentru purificare, concentrare si uscare sub vid, obtinandu-se produsul galactomanan de puritate 90-97, caracterizat prin M= 200-1000 Daltoni, si formula C₂₄H₄₈O₃₂, in cantitate de 32 g din 100 g seminte schinduf. Procedul implica utilizarea solventilor : hexan, heptan, octan, ciclohexan si a solutiilor hidroalcoolice :1:9---9:1. Procedul este laborios si utilizeaza solventi usor inflamabili.

Handwritten signatures and initials: LW, B, X, etc.



Stamp: BIOTEHNOS S.A. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

-Conform brevetului JP 2005060366 (A)-2005-03-10, se propune un stimulator al procesului de lipoliza, ce contine drept ingredient activ o planta sau un extract dintr-o planta cum ar fi: ienupar, radacini de polygala, patlagina, mustar alb, iedera, trandafir japonez, schinduf. Extractul se poate obtine prin oricare din metodele extractie: simpla sau Soxhlet, la temperatura obisnuita sau la fierbere, cu amestecuri hidroalcoolice sau diferiti solventi propilenglicol, butilenglicol, cetone, acetat de etil;conditiile de extractie difera in functie de solvent.Astfel, din seminte de schinduf se obtine un preparat sub forma unui extract hidroalcoolic, caracterizat prin reziduul la evaporare de 1,4 g/100 mL.

-Brevetul WO 2005009453 (A1)-2005-02-03 propune obtinerea unei pudre din semintele de schinduf, din care s-a indepartat fractia amara si cea lipidica utilizat ca supliment nutritiv datorita continutului in fibre solubile , vitamine, aminoacizi, in principal 4-hidroxiizoleucina.

-Jin Mu Hyeon in brevetul KR 20040059006 (A)-2004-07-05 propune o compozitie cosmetica de albire ce contine un extract de schinduf obtinut prin extractia cu unul din solventii: apa, alcool inferior, acetat de etil, acetona. Extractul obtinut nu este caracterizat, nefiind prezentata compozitia chimica.

-Procese de extractie a semintelor de schinduf sunt prezentate in brevetele: US 5,658,571-Gopalan si colab., US 5,997,877-Chang si colab, US 6,013,289-Blank , US 6,013,304-Todd, US 6,495,175 Rao si colab.dar in nici unul dintre aceste brevete nu se valorifica integral componentele bioactive ale semintelor de schinduf.

-Astfel, Gopalan US 5,658,571 prezinta un proces static utilizand un singur solvent obtinandu-se un amestec al fractiunilor, deci nu se revendica separarea fractiunilor individuale prin extractia secventiala, succesiva utilizand solventi de polaritati diferite. De asemenea, Gopalan prevede incalzirea extractului dupa ce semintele au fost imersate in solvent. Alaturi de alcoolul izopropilic sau etilic se pot folosi si alti solventi organici cum ar fi cei clorurati toxici neadecvati utilizarii in scopuri alimentare.

-Chang prin brevetul US 5,997,877 propune un procedeu dinamic de obtinere a diferitelor fractii valoroase comercial din schinduf. Conform acestui brevet din semintele de schinduf se pot obtine urmatoarele preparate: fibre alimentare solubile in cantitate de 30-48 g/100 g seminte cu o concentratie cuprinsa intre 89-96% si un preparat de oleorezine in cantitate de 11,75 g/100 g seminte ce includ si saponinele steroidice (dioscina). Caracterizarea chimica a preparatului de oleorezine se face conform brevetului amintit doar prin continutul de saponine exprimate in agliconul corespunzator, diosgenina de 1,4%.Pentru extractia oleorezinelor se foloseste alcoolul etilic 95%, iar materia prima virgina sau deja extrasa, dezparfumata se poate folosi la obtinerea fibrelor solubile prin extractia cu apa. Utilizarea comerciala a

Handwritten signatures and a circular stamp.
Stamp: ROMANIA, BIOTEHNOS, S.A., 12A, 2, IASI

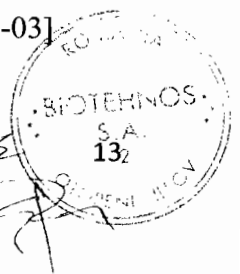
oleorezinelor se refera la folosirea acestora ca ingredient de imitare/inlocuire a aromei de artar, in alimentatie. Procedeul prezinta o serie de dezavantaje prin aceea ca produce oleorezine fara a extrage uleiul, de aceea acestea s-ar putea sa fie in amestec cu uleiul determinand astfel un gust amar si posibilitatea de a rancezi. De asemenea, pentru a creste umiditatea semintelor, se foloseste apa inainte de a realiza extractia cu alcool etilic si a indeparta uleiul. Metoda aplicata este total diferita de cea propusa de brevetul de inventie propus de noi.

-US 6,495,175 Rao si colab. revendica obtinerea componentelor din semintele de schinduf in etape, astfel in prima extractie realizata la cald , utilizand eter de petrol, hexan, n-propanol, izopropanol sau combinatii ale acestora se obtine un extract care prin prelucrare-distilare se obtine uleiul, iar prin extractia la cald cu al doilea solvent care poate fi etanol, izopropanol, izopropanol apos, etanol apos si combinatii ale acestora rezulta un amestec de oleorezine si ulei. Pentru separarea oleorezinelor de ulei masa obtinuta prin distilarea solventului de extractie se suspenda in alcool etilic 95% timp de 45-90 minute la temperatura 45-55 grade Celsius, urmata de racire la -10sau -15 grade Celsius. Materia vegetala solida ramas dupa cea de-a doua extractie reprezinta fibrele alimentare dezparfumate si delipidizate, de culoare galbe-cafeniu deschis. Rao revendica si un sistem/instalatie de extractie alcatuit dintr-un condensator, un vas de extractie, redistilator, rezervor de extract, bucla reintroducere a solventului in sistem. Atat oleorezinele, uleiul si fibrele alimentare nu sunt caracterizate, standardizate, printr-o compozitie chimica si un randament de extractie.

Majoritatea brevetelor de inventie referitoare la *Trigonella foenum graecum*-schinduf prezinta utilizarea diferitelor componente izolate pentru:

- uz intern in alimentatie sau ca suplimente nutritive [Brevetul US 6013289 (A)-2001-01-11]-ca agent/compozitie de parfumare in alimentatie; agent cardiotropic sub forma unui preparat lichid din seminte de schinduf [Brevetul RU 2192271 (C1)-2002-11-10];
- produs farmaceutic pe baza de galactomanani, in tratarea problemelor legate de diabet pentru abilitatea acestora de a retine apa si a scaderii absorbtiei intestinale a glucozei [brevetul WO 2009136219 (A1)-2009-11-12]; [WO 0174371 (A1)-2001-10-11];
- extract apos din semintele de schinduf ca agent de conservare, dezinfectant sau pentru tratarea herpesului, a dermatitelor, acneei, rani infectate, periodontite [US 20100129296-05.27.2010];
- supliment nutritiv sub forma de pudra, utilizat datorita continutului in fibre solubile, vitamine si aminoacizi, mai ales 4-hidroxiizoleucina; [WO 2005009453(A1)-2005-02-03]

Stimbu
St *alt* *St*



BIOTEHINOS
S.A.
137
ROMANIA

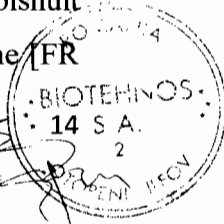
- extract cu utilizari farmaceutice, alimentare sau ca suplimente, pentru revitalizarea parului, unghiilor, parului, de uz oral sub forma de capsule sau tablete, cu un continut de saponine sau sapogenine de 0,1-0,2 g extract/capsula [EP 1900356 (A1)-2008-03-19];
- stimularea procesului de lipoliza in produse cosmetice,utilizand un extract hidroalcoolic dintr-o planta cum ar fi: ienupar, radacini de polygala, patlagina, mustar alb, iedera, trandafir japonez, in care extractul de schinduf este caracterizat chimic prin reziduul la evaporare 1,4g/100mL-[JP 2005060366 (A)-2005-03-10];
 - ulei pentru utilizari cosmetice si/sau alimentare, sub forma de capsule sau in flacoane, pentru proprietatile antioxidante, ca agenti tensioactivi, tratarea uscaciunii cutanate, sau scaderea nivelului colesterolului[FR 2867686 (A1)-2005-09-23];
 - pentru albirea pielii o compozitie cosmetica ce contine un extract de schinduf [KR 20040059006 (A)-2004-07-05];
 - pentru ingrijirea parului si pielii un extract de schinduf cu un continut in diosgenina de minim 0,03g/100 mL iar in prdusul final cosmetic o concentratie cuprinsa intre 0,00015-0,003% [DE 102005057292 (A1)-2007-06-06];

Din datele prezentate cu privire la stadiul tehnicii in domeniul obtinerii unor substante sau produse bioactive cu utilizari cosmetice din planta *Trigonella foenum graecum*-seminte de schinduf, rezulta urmatoarele:

- Nu s-au realizat procedee ecologice de valorificare a intregului potential de compusi bioactivi existent in planta *Trigonella foenum graecum* prin obtinerea a 4 tipuri de componente active separate in acelasi proces tehnologic, in mod obisnuit planta se utilizeaza pentru obtinerea a maxim 2-3 clase de substante active sau a unui amestec al fractiunilor;
- Nu s-au realizat produse cosmetice cu componente izolate din aceasta planta,cu activitate estrogen mimetica evidentiata prin studii la nivel celular;
- Brevetele de inventie referitoare la utilizarea plantei *Trigonella foenum graecum* prezinta procedee de obtinere a unor compozitii farmaceutice, nutritive sau alimentare, in principal pentru uz oral; utilizarea topica cosmetica se reduce la actiunea dezinfectanta, antiinflamatoare, de albire, de ingrijire a parului si pielii, revitalizare, tratarea uscaciunii pielii, antioxidanta;

Dezavantajele acestor brevete ce prezinta procedeele si produsele obtinute din seminte de schinduf constau in:

- Materia prima vegetala este utilizata neeconomic, umarindu-se obtinerea in mod obisnuit a unei clase sau a amestecului a doua clase de substante cum ar fi:ulei si oleorezine [FR

L. Glauk
Al


2867686 (A1)-2005-09-23; oleorezine si saponinele steroidice [FR 1496965 (A)-1967-10-06; EP 1900356 (A1)-2008-03-19, ulei si fibrele solubile si/sau insolubile - mucopolizaharide de tipul galactomananilor,[WO 0174371 (A1)-2001-10-11; WO 2009136219 (A1)-2009-11-12] sau utilizarea extractului de schinduf- caracterizat prin continutul de 4-hidroxiizoleucina [WO 2005009453 (A1)-2005-02-03]sau in diosgenina aflata in cantitate foarte mica [DE 102005057292 (A1)-2007-06-06 DE 102005057292 (A1)-2007-06-06]- sau a amestecurilor fractiunilor [US 5,658,571], ceilalti compusi ramanand in planta aceasta considerandu-se deseuri;in nici unul dintre aceste brevete nu se valorifica integral componentele bioactive ale semintelor de schinduf.

-Utilizarea solventilor inflamabili, ce nu sunt de calitate farmaceutica: eter de petrol, hexan, n-propanol, izopropanol US 6,495,175 Rao, FR 2867686 (A1)-2005-09-23;

- Extractia uleiului si oleorezinelor are loc cu consumuri energetice mari- la cald, 6,495,175 Rao sau in instalatii costisitoare-cu fluide supercritice sau neadequate valorificarii industriale-Soxhlet FR 2867686 (A1)-2005-09-23;

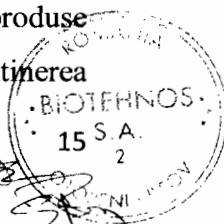
- Produsele obtinute in brevetele prezentate nu sunt standardizate in componentele active sau nu sunt prezentate date legate de compozitia chimica sau randamentele de obtinere, KR 20040059006 (A)-2004-07-05 ; FR 1496965 (A)-1967-10-06 ;

Brevetul rezolva problema tehnica de valorificare ecologica a resurselor de plante medicinale, posibil de aplicat la scara industriala, prin care se utilizeaza integral componentele biologice active ale plantei *Trigonella foenum graecum*, ce presupune cultivarea plantei in sistem ecologic, obtinerea materiei prime vegetale necesare, extractia selectiva in trepte si separarea componentelor farmaceutic si cosmetic active, reciclarea materiilor vegetale si a resurselor utilizate, prin obtinerea:

- materiei prime vegetale in cultura ecologica alternativa

- obtinerea unor randamente optime si nu maxime conform principiilor tehnologiilor ecologice , cu valorificarea tuturor resurselor ;prin parametrii tehnologici aplicati in instalatia de extractie se imprima o viteza mare de separare a componentelor din planta datorita amplasarii in interiorul buclei a unei pompe centrifuge de viteza mare determinand o scadere a timpului de extractie de la 4 ore la 2-3 ore/etapa;

- compusului lipofil, sub forma unui lichid galben, usor opalescent cu un continut standardizat in acizi grasi mono si polinesaturati ω -3 si ω -6 componenti ai vitaminei F de min.80%, denumit U1,obtinut in cantitate de 3-5 g/100 g materie prima uscata, utilizat in produse cosmetice pentru a facilita transportul componentelor liposolubile, a ajuta la mentinerea

Alina
Alina


permeabilitatii normale a membranelor celulare, cu efecte directe asupra pielii si parului, carenta in acesti acizi esentiali determinand aparitia acneei infantile, eczemelor, pruritului;

- extractului selectiv conditionat fie in glicerina, propilenglicol, butilenglicol sub forma unui lichid brun roscat limpede, cu miros caracteristic, standardizat in saponine steroidice totale de min.1% si compusi falvonoidici de min.0,15g/100 mL, denumit (SKs2), obtinut in raport 1:1-3:1 materie prima vegetala:extract; fie sub forma de pulbere portocalie, cu un continut in saponine steroidice totale de min.8% si compusi falvonoidici de min.1,5g/100 g obtinut in cantitate de min.8 g/100 g seminte, denumit Ps2;

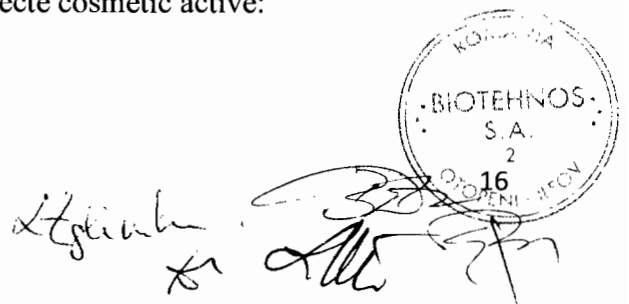
- extractului selectiv conditionat fie in glicerina, propilenglicol, butilenglicol standardizat in agliconi steroidici totali 0,2-0,3% din care diosgenina 0,1-0,15% si in compusi polifenolici exprimati in acid cafeic de 0,15-0,2% obtinut in raport 1:1-3:1 materie prima vegetala:extract, denumit Ska3; sau compus steroidic brut, sub forma de pulbere cafenie, cu un continut in aglicon steroidic total de 8-10% obtinut in cantitate de minim 1,5 g/100 g materie prima denumit Pa3, din care prin operatii succesive de purificare se obtine produsul purificat cu un continut in diosgenina cuprins intre 60-90%;

- complexului bioactiv polizaharidic cu structura de galactomanani, sub forma unei pulberi fine, gri-cafenii, cu un continut standardizat in fibre solubile in apa de min.85%, obtinut in cantitate de minim 20 g /100 g materie prima, denumit PP4;

- ingrasamant verde, constituit din materia prima din care au fost extrase componentele cosmetic active, ce se recicleaza sub forma de compost prin incorporarea in aratura din sol, obtinut in cantitate de maxim 60 g/100 g materie prima.

Prin aplicarea acestui procedeu se valorifica tehnologic la nivel industrial intregul potential terapeutic si nutritional al materiei prime vegetale, dupa recoltarea semintelor planta uscata se foloseste ca nutret pentru animale, iar semintele uscate devin materie prima in industria cosmetica se supun unui flux de extractie, in care dupa extractia primara, se obtine extractul lipidic care prin prelucrare si purificare duce la obtinerea uleiului-produsul U1 iar materia vegetala devine materie prima pentru urmatoarele etape de extractie ce utilizeaza solventi din ce in ce mai polari, pana la apa distilata; dupa fiecare etapa materia vegetala extrasa devine materie prima in etapa urmatoare; compusii astfel separati se conditioneaza fiecare dupa scopul de utilizare urmarit, devenind intermediari farmaceutic sau cosmetic activi.

Produsele obtinute conform prezentei inventii prin extractii si separari succesive din semintele de *Trigonella foenum graecum* prezinta urmatoarele efecte cosmetic active:



Handwritten signatures and a circular stamp of BIOTEHNOS S.A. with the number 16.

- actiune estrogen mimetica in ceea ce priveste proliferarea celulara si sinteza de colagen (pentru Ska3 si agliconul diosgenina),
- efect antiinflamator (pentru agliconul diosgenina din componenta Ska3),
- efect antimicrobian (pentru Ska3 si Sks2),
- actiune fotoprotectoare fata de radiatia UV_A si UV_B din punct de vedere al inducerii apoptozei, stopare a inflamatiei si anti-angiogenic (pentru Ska3 si Sks2),
- supraexpresia integrinelor $\alpha 2\beta 1$ cu rol in fibrilogeneza si formarea legaturilor colagen-celula, cu rol structural si de mentinere a fermitatii tesutului cutanat (pentru Ska2)
- refacere naturala a nivelului de hidratare al pielii, a homeostaziei hidro-lipidice epidermale, prin continutul in **acizi grasi polinesaturati** (oleic si linoleic), constituinti ai membranelor celulare (pentru U1 si PP4), fiind aplicabile in formulari de uz topic pentru **prevenirea si combaterea imbatranirii cutanate si a modularii fito-hormonale si anti-microbiene in acnee.**

Conform tehnologiei propuse se obtin 4 preparate diferite ce reprezinta intermediari bioactivi pentru industria cosmetica, astfel: materia prima vegetala semintele de Trigonella foenum graecum-schinduf, uscate si macinate se extrag succesiv in trei trepte, cu acetona timp de 2 ore/treapta in instalatia de extractie rapida, solutiile obtinute se supun operatiilor de concentrare pentru recuperarea solventului si obtinerea extractului brut uleios, care se supune purificarii prin filtrare si distilare inaintata sub vid pentru eliminarea urmelor de apa si solvent de extractie, rezultand uleiul purificat de schinduf in cantitate de 30-70 g/kg planta cu un continut in acizi grasi esentiali mono si polinesaturati ω -3 si ω -6, componenti ai vitaminei F de min.80% . A doua etapa consta in separarea componentelor steroidice glicozidate sub forma unui amestec de saponine, prin extractia materiei prime existente in vasul de extractie cu alcool etilic 80- 96% de calitate farmaceutica, in trei trepte, timp de 2 ore/treapta solutiile extractive obtinute se supun concentrarii sub vid, recuperarii solventului si reintroducerii acestuia in proces si apoi fie conditionarii in propilenglicol, glicerina sau butilenglicol, solventi cosmetic admisi cu obtinerea preparatului SKs2 sub forma unui lichid brun roscat limpede, cu miros caracteristic, standardizat in saponine steroidice totale de min.1% si compusi falvonoidici de min.0,15g/100 mL, obtinut in raport 1:1- 3:1 materie prima vegetala:extract; fie solutiile extractive obtinute se usuca prin concentrare sub vid iar produsul obtinut se suspenda in acetona pentru separarea compusilor steroidici glicozidati de

Agliconul
si

BIOTEHNOS.
S A17
2012
29/06/2012

oleozine, obtinandu-se produsul Ps2 sub forma de pulbere portocalie, cu un continut in saponine steroidice totale de min.8% si compusi falvonoidici de min.1,0g/100 g, obtinut in cantitate de min.80 g/1kg materie prima.

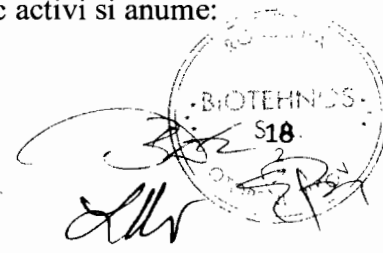
A treia etapa consta in separarea componentelor steroidice libere prin extractia materiei prime ramasa in vasul de extractie dupa etapa a doua, cu solutii hidroetanoliche cu o concentratie cuprinsa intre 40-70%, cel mai bine 60% de calitate farmaceutica, in trei trepte, timp de 1-2 ore/treapta, solutiile extractive obtinute se supun concentrarii sub vid, recuperarii solventului si reintroducerii acestuia in proces; extractul concentrat apos obtinut ce se gaseste in instalatia de concentrare se supune operatiei de hidroliza acida sub vid timp de 1 ora; extractul obtinut se neutralizeaza se filtreaza si se usuca obtinand preparatul brut sub forma de pulbere brun-cafenie cu un continut in aglicon steroidic total de 8-10% obtinut in cantitate de minim 20 g/1kg materie prima denumit Pa3, din care prin operatii succesive de purificare se poate obtine produsul purificat cu un continut in diosgenina cuprins intre 60-90%;

A patra etapa consta in obtinerea complexului bioactiv polizaharidic cu structura de galactomanani, si se realizeaza prin extractia materiei prime ramasa in vasul de extractie dupa etapa a treia, cu apa purificata incalzita la 30-60 grade Celsius, in trei trepte, timp de 1 ora/treapta, solutiile extractive obtinute se racesc, se filtreaza sub vid si se supun operatiei de precipitare in raport 1:2-1:5 cu alcool etilic 80-90 % de calitate farmaceutica; precipitatul alb obtinut se separa prin filtrare sub vid si se usuca in curent de aer cald la 50-60 grade Celsius, obtinandu-se preparatul PP4 sub forma unei pulberi fine, gri-cafenii, cu un continut standardizat in fibre solubile in apa de min.85%, obtinut in cantitate de minim 200 g /1 kg materie prima , denumit PP4;

Materia prima vegetala epuizata in componentele urmarite, se recicleaza sub forma de compost prin incorporarea in aratura din sol si se obtine in cantitate de maxim 600 g/1 kg materie prima.

Avantajele inventiei în raport cu stadiul tehnicii sunt următoarele:

- Prezinta un procedeu tehnologic aplicabil la nivel industrial de valorificare integrala si ecologica a resurselor plantei *Trigonella foenum graecum*, ce presupune cultivarea plantei in sistem ecologic, obtinerea semintelor de schinduf- materie prima vegetala necesara extractiei selective in trepte si separarea componentelor farmaceutic si cosmetic active, dar si reciclarea materiilor vegetale si a resurselor utilizate, prin obtinerea: materiei prime vegetale in cultura ecologica alternativa si a 4 preparate/ intermediari farmaceutic/cosmetic activi si anume:

Agliu
xi
Allr


- compus lipofil, sub forma unui lichid galben, usor opalescent cu un continut standardizat in acizi grasi mono si polinesaturati ω -3 si ω -6 componenti ai vitaminei F de min.80%, denumit U1,obtinut in cantitate de 3-5 g/100 g materie prima uscata;
- extract selectiv conditionat fie in glicerina, propilenglicol, butilenglicol sub forma unui lichid brun roscat limpede, cu miros caracteristic, standardizat in saponine steroidice totale de min.1% si compusi falvonoidici de min.0,15g/100 mL, denumit (SKs2) , obtinut in raport 1:1-3:1 materie prima vegetala:extract; sau sub forma de pulbere portocalie, cu un continut in saponine steroidice totale de min.8% si compusi falvonoidici de min.1,0g/100 g obtinut in cantitate de min.8 g/100 g seminte, denumit Ps2;
- extract selectiv conditionat fie in propilenglicol standardizat in agliconi steroidici totali 0,2-0,3% din care diosgenina 0,1-0,15% si in compusi compusi polifenolici exprimat in acid cafeic de 0,15-0,2% obtinut in raport 1:1-3:1 materie prima vegetala:extract, denumit Ska3; fie compus steroidic brut , sub forma de pulbere cafenie, cu un continut in aglicon steroidic total de 8-10% obtinut in cantitate de minim 2 g/100 g materie prima denumit Pa3, din care prin operatii succesive de purificare se obtine produsul purificat cu un continut in diosgenina cuprins intre 60-90%;
- complex bioactiv polizaharidic cu structura de galactomanani, sub forma unei pulberi fine, gri-cafenii, cu un continut standardizat in fibre solubile in apa de min.85%, obtinut in cantitate de minim 20 g /100 g materie prima , denumit PP4;
- ingrasamant verde, constituit din materia prima din care au fost extrase componentele cosmetic active, ce se recicleaza sub forma de compost prin incorporarea in aratura din sol obtinut in cantitate de maxim 60 g/100 g materie prima.
- tehnologia de extractie si separare a componentelor active farmaceutic si cosmetic, prin parametrii tehnologici aplicati determina conform principiilor tehnologiilor ecologice obtinerea unor randamente optime si nu maxime, cu valorificarea tuturor resurselor si reciclarea pe cat posibil a acestora;
- instalatia de extractie utilizata, imprima o viteza mare de extractie a componentelor din planta datorita amplasarii in interiorul buclei a unor pompe centrifuge de viteza mare (2900 rpm) pentru recircularea solventului/miscelei , determinand o scadere a timpului de extractie de la 4 ore la 1-2 ore/etapa;
- comparativ cu produsele realizate din Trigonella foenum graecum, conform brevetelor menționate la stadiul tehnicii la care s-au evidentiat actiunile: dezinfectanta, antiinflamatoare, de albire, de ingrijire a parului si pielii, revitalizare, tratarea uscaciunii pielii, antioxidanta, la preparatele fitoterapice conform inventiei, s-au demonstrat prin studii la nivel celular

activitatea estrogen mimetica, antiinflamatoare, antimicrobiana, fotoprotectoare fata de radiatia UV_A si UV_B, sustinute de studiile de actiune specifica „in vitro” realizate pe linii celulare standardizate: HaCaT (keratinocit uman normal), HS 27 (fibroblast dermic uman normal), HUVEC (endoteliu vascular).

Procedeeul conform invenției constă in valorificarea tehnologica la nivel industrial a intregului potential terapeutic si nutritional al materiei prime vegetale, dupa recoltarea semintelor planta uscata se foloseste ca nutret pentru animale, iar semintele ce devin astfel materie prima se supun aceluiasi flux de extractie , uscate si macinate fin, sitate prin sita 3-4 se extrag succesiv in trei trepte, in raport 1:5-1:10 cu acetona timp de 1-2 ore/treapta in instalatia de extractie, la temperatura de 18-25°C solutiile extractive obtinute se supun operatiilor de concentrare sub vid la 30- 40°C, pentru recuperarea solventului, reintroducerea acestuia in sistemul de extractie si obtinerea extractului brut uleios, care se supune purificarii prin filtrare si distilare inaintata sub vid pentru eliminarea urmelor de apa si solvent de extractie, rezultand uleiul purificat de schinduf in cantitate de 30-70 g/kg planta cu un continut in acizi grasi esentiali mono si polinesaturati, ω -3 si ω -6 componenti componentii ai vitaminei F de min.80% .

Pentru obtinerea preparatului Sks2, materia prima existenta deja in vasul de extractie se extrage cu alcool etilic 80-96% de calitate farmaceutica, in trei trepte, in raport 1:8-1:12, timp de 1-2 ore/treapta, la temperatura de 18-25°C solutiile extractive obtinute se supun concentrarii sub vid la temperatura 30- 40°C, pentru recuperarea solventului si reintroducerea acestuia in sistemul de extractie , si apoi fie conditionarii in propilenglicol, glicerina sau butilenglicol, solventi cosmetic admisi in raport de 2:1 materie prima: preparat final, cu obtinerea preparatului SKs2 sub forma unui lichid brun roscat limpede, cu miros caracteristic, standardizat in saponine steroidice totale de min.1% si compusi falvonoidici de min.0,15g/100 mL, fie solutiile extractive obtinute se usuca prin concentrare sub vid iar produsul obtinut se suspenda in acetona pentru separarea compusilor steroidici glicozidati de oleorezine, obtinandu-se produsul Ps2 sub forma de pulbere portocalie, cu un continut in saponine steroidice totale de min.8% obtinut in cantitate de min.8 g/100 g seminte.

Pentru obtinerea preparatelor Ska3 si Pa3 este necesara separarea componentelor steroidice sub forma de agliconi, ce se realizeaza prin extractia materiei prime ramasa in vasul de extractie dupa etapa a doua cu solutii hidroetanoliche cu o concentratie cuprinsa intre 40-70%, cel mai bine 60% de calitate farmaceutica, in raport 1:12-1:15, in trei trepte, timp de 2 ore/treapta, la temperatura de 18-25°C , solutiile extractive obtinute se supun concentrarii sub

Optim
S.A. 20
BIOTEHNOS

vid la 30- 40°C, recuperarii solventului si reintroducerii acestuia in proces; extractul concentrat apos obtinut ce se gaseste in instalatia de concentrare se supune operatiei de hidroliza acida cu HCl 2N, sub vid, la 40-50°C, timp de 1 ora; extractul obtinut se neutralizeaza se filtreaza si se usuca obtinand preparatul brut in cantitate de minm 20 g/kg materie prima vegetala sub forma de pulbere brun-cafenie notat PP3 cu un continut in aglicon steroidic de 10-15% exprimat in diosgenina din care prin purificari succesive se obtine preparatul purificat Pa3 cu un continut in diosgenina cuprins intre 60-90% in functie de utilizari; pentru a obtine preparatul sub forma de extract fluid pulberea obtinuta se dizolva in alcool etilic 96 sub vid, la reflux timp de 1 ora si apoi se prelucreaza prin includerea intr-un solvent cosmetic:propilenglicol, glicerina, butilenglicol , in raport 1:1 materie prima: preparat final, denumit Ska3 standardizat in agliconi steroidici totali de 0,2% si diosgenina de 0,1%.

Obtinerea complexului bioactiv polizaharidic cu structura de galactomanani, se realizeaza prin extractia materiei prime ramasa in vasul de extractie dupa etapa a treia, cu apa purificata incalzita la 30-60 grade Celsius, in raport 1:25-1:50, in trei trepte, timp de 1 ora/treapta, solutiile extractive obtinute se racec la temperatura ambianta si sunt supuse precipitarii, in raport 2:1 alcool etilic farmaceutic 80- 96% : extract polizaharidic v/v; amestecul astfel obtinut este mentinut la 4-8°C minim 4 ore; precipitatul alb cu aspect de fuior obtinut se separa prin filtrare sub vid si se usuca in curent de aer cald la 60-70 grade Celsius, obtinandu-se preparatul PP4 sub forma unei pulberi fine, gri-cafenii, cu un continut standardizat in fibre solubile in apa de min.85%, obtinut in cantitate de minim 200 g /kg materie prima .


Materia prima vegetala epuizata in componentele urmarite, se recicleaza sub forma de compost, prin incorporarea in aratura din sol, si se obtine in cantitate de maxim 600 g/kg materie prima.

În continuare sunt descrise exemple de realizare a invenției, care se referă la procedeul de obținere a produselor cosmetic active din planta *Trigonella foenum graecum*, -seminte de schinduf, la testele efectuate în vederea evidențierii activității specifice și evaluării aplicațiilor în terapeutică, precum și produsele dermato- cosmetice condiționate

Exemplul de realizare 1. Procedeul de obținere a preparatelor cosmetic active din planta *Trigonella foenum graecum*

A. Obținerea preparatului U1-ulei din seminte de schinduf standardizat in acizi grasi esentiali ω -3 si ω -6

10 kg materie prima vegetala seminte uscate si macinate ale plantei *Trigonella foenum graecum* se introduc in instalatia de extractie rapida ce are montata o bucla de recirculare formata din doua pompe centrifuge, si se supun extractiei dinamice in acelasi flux, primul

L. Blin
gi
[Signature]


solvent utilizat este acetona in raport 1:10 timp de 2 ore/treapta in instalatia de extractie, la temperatura de 18-25°C solutiile extractive obtinute in cantitate de 75 L se supun operatiilor de concentrare sub vid la 30- 40°C, pentru recuperarea solventului, reintroducerea acestuia in sistemul de extractie si obtinerea extractului brut uleios in cantitate de 425 g, care se supune purificarii prin filtrare si distilare inaintata sub vid pentru eliminarea urmelor de apa si solvent de extractie, rezultand uleiul purificat de schinduf in cantitate de 390 g planta cu un continut in acizi grasi esentiali mono si polinesaturati, ω -3 si ω -6 componenti ai vitaminei F de min.80% .

B. Obtinerea preparatului Sks2 din seminte de schinduf standardizat in saponine steroidice

Pentru obtinerea preparatului Sks2, materia prima existenta deja in vasul de extractie se extrage in continuare cu alcool etilic 85% de calitate farmaceutica, in trei trepte, in raport 1:12, timp de 2 ore/treapta, la temperatura de 18-25°C solutiile extractive obtinute in cantitate de 90 L se supun concentrarii sub vid la temperatura 30- 40°C, pentru recuperarea solventului si reintroducerea acestuia in sistemul de extractie ,iar extractul concentrat obtinut se conditioneaza in glicerina in raport de 2:1 materie prima: preparat final, cu obtinerea preparatului SKs2 sub forma unui lichid brun roscat limpede, cu miros caracteristic, standardizat in saponine steroidice totale de min.1% si compusi falvonoidici de min.0,15g/100 mL;

C. Obtinerea preparatului Ska3 din seminte de schinduf standardizat in agliconi steroidici

Pentru obtinerea preparatului Ska3 se separa componentelor steroidice sub forma de agliconi, prin extractia materiei prime ramasa in vasul de extractie dupa etapa a doua cu solutii hidroetanolic 60% de calitate farmaceutica, in raport 1:15, in trei trepte, timp de 2 ore/treapta, la temperatura de 18-25°C , solutiile extractive obtinute 110 L se supun concentrarii sub vid la 30- 40°C, recuperarii solventului si reintroducerii acestuia in proces; extractul concentrat apos obtinut in cantitate de 7,5 L ce se gaseste in instalatia de concentrare se supune operatiei de hidroliza acida cu HCl 2N, sub vid, la 40-50°C, timp de 1 ora; extractul obtinut se neutralizeaza se filtreaza si se usuca obtinand preparatul brut in cantitate de minm 220 g sub forma de pulbere brun inchis cu un continut in aglicon steroidic de 10-15% exprimat in diosgenina din care pentru a obtine preparatul sub forma de extract fluid pulberea obtinuta se dizolva in alcool etilic 96% sub vid, la reflux timp de 1 ora si apoi se conditioneaza prin includerea in glicerina, in raport 1:1 materie prima: preparat final, denumit Ska3 standardizat in agliconi steroidici totali de 0,2% si diosgenina de 0,1%.

[Handwritten signatures and a circular stamp]

Stamp: BIOTEHNIOS S.A. 22

D. Obținerea preparatului PP4 din seminte de schinduf standardizat in fibre solubile

Peste materia prima ramasa in vasul de extractie dupa etapa a treia, se introduc 250L apa purificata incalzita la 40 grade Celsius, in trei trepte, timp de 1 ora/treapta, solutiile extractive obtinute se racesc la temperatura ambianta se concentreaza pana la un volum de 25 L si sunt supuse precipitarii, in raport 2:1 alcool etilic farmaceutic 80% : extract polizaharidic v/v; amestecul astfel obtinut este mentinut la refrigerator la 4-8°C minim 4 ore; precipitatul alb cu aspect de fuior obtinut se separa prin filtrare sub vid si se usuca in curent de aer cald la 60-70 grade Celsius, obtinandu-se preparatul PP4 sub forma unei pulberi fine, gri-cafenii, cu un continut standardizat in fibre solubile in apa de min.85%, obtinut in cantitate de minim 2kg.

Materia prima vegetala epuizata in componentele urmarite, obtinuta in cantitate de 6 kg se ambaleaza in saci de rafie si se recicleaza sub forma de compost prin incorporarea in aratura din sol.

TESTELE EFECTUATE ÎN VEDEREA EVIDENȚIERII ACTIVITĂȚII SPECIFICE ȘI EVALUĂRII APLICAȚIILOR ÎN TERAPEUTICĂ A COMPONENTELOR COSMETIC ACTIVE OBTINUTE PRIN VALORIFICAREA INTEGRALA A PLANTEI TRIGONELLA FOENUM GRAECUM

Demonstrarea activitatii estrogen mimetice a preparatelor fitoterapice Ska3 si Pa3

Fibroblastii si keratinocitele exprima receptori pentru estrogeni, procese de tipul proliferarii, morfogenezei, diferentierii sau apoptozei, fiind strict reglate de cuplarea acestor receptori la liganzi (molecule semnal, principii bioactive). [1]. Pentru a testa efectul estrogen mimetic a componentelor bioactive Ska3 si Pa3 s-a realizat simularea „in vitro” a conditiilor de depletie hormonală utilizandu-se doua serii de testare paralele, una cu celule cultivate cu mediu cu un continut normal de estrogeni, cealalta cu mediu fara estrogeni.

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

S-a utilizat, de asemenea si **linia celulara standardizata HS27** de fibroblasti dermici umani, intre pasajele 15-22. Testarea s-a realizat pe celule aderate timp de 48 h. in flask-uri de cultura de 12.5 cm², in mediu Dulbecco's modified Eagle's medium continand 10% ser fetal bovin, 1% antibiotic/antimycotic si incubate la 37°C in atmosfera de 5%CO₂. Actiunea substantelor s-a evaluat dupa 48h. de incubare.

[Handwritten signature]
[Handwritten signature]
[Handwritten signature]
BIOTERMINOS S.A.
23

S-au realizat 2 serii de testare, una cu continut normal de estrogeni in mediul de cultura, cealalta cultivata in conditii de depletie estrogenica (ser fetal fara estrogeni). S-a analizat statusul proliferativ celular pentru *Ska3* si *Pa3*, prin tehnici complementare de analiza: secventialitatea ciclului celular si succesiunea generatiilor proliferative (citometrie in flux, marcarea cu iodura de propidiu si respectiv CFSE - carboxy fluorescein diacetat succinimid ester), corelate in cazul *Pa3* si cu determinarea influentei asupra sintezei de colagen si a activitatii metaloproteinazelor.

Rezultatele s-au estimat ca Indice de Proliferare, respectiv suma procentelor de celule in fazele de multiplicare S si G2/M. calculate cu un soft de analiza specific (FACS Express V3 modulul DNA cell cycle si proliferare).

Tabelele de mai jos prezinta actiunea compusilor *Ska3* si *Pa3* asupra liniilor celulare standardizate de fibroblasti umani normali (HS 27) (tabelul1) si keratinocite imortalizate (HaCaT) (tabelul 2), comparativ cu martorul pozitiv (beta estradiolul 1nM):

	mediu cu continut estrogenic normal				mediu cu deficit estrogenic			
	%S+ %G2/M	%variatie (%S+G2/M)	I.P.	IP	%S+ %G2/M	%variatie (%S+G2/M)	I.P.	IP
Martor cel	26,73		3,04		24		2,82	
Martor solvent	25,86	-3,25	3,27	7,57	35,8	49,17	2,85	1,06
Pa3 1nM	29,9	11,86	4,11	25,69	42,3	76,25	2,83	-0,70
Pa3 5nM	32,11	20,13	4,39	44,41	43,7	82,08	2,89	1,40
Pa3 10nM	30,7	14,85	3,05	0,33	55	129,17	4,62	62,11
Ska3 1/8000	30,79	19,06	5,17	58,10	49,8	39,11	3,86	35,44
Ska 3 1/16000	29,71	14,89	3,01	-7,95	28,86	-19,39	4,47	56,84
Ska 3 1/32000	27,83	7,62	3,18	-2,75	28,03	-21,70	2,19	-23,16
beta estradiol 1nM	32,11	20,13	3,24	-0,92	35,61	48,38	3,91	38,65

Tabelul nr.1: Efectul compusilor asupra liniei celulare HS 27 (fibroblasti dermici umani normali)

	mediu cu continut normal de estrogeni				mediu fara estrogeni			
	I.P.	IP	% celule (S+G2/M)	%variatie (%S+G2/M)	I.P.	IP	% celule (S+G2/M)	%variatie (%S+G2/M)
Martor	3,1		47,42		2,51		42,28	
PG	2,96		48,75		2,21		41,41	
Pa3 5nM	3,05	3,04	45,12	-7,44	3,53	59,58	43,70	5,52
Pa3 10nM	3,12	5,29	48,76	0,02	3,24	46,61	50,71	22,44

Handwritten signature and stamp. The stamp is circular and contains the text "BIOFILHOS" and the number "24".

Pa3 20nM	2,85	-3,82	46,94	-3,71	2,87	29,71	46,70	12,76
Pa3 40nM	4,17	40,72	52,80	8,31	3,26	47,36	48,44	16,96
Pa3 1/64000	2,99	0,90	44,41	-8,90	3,02	36,80	47,77	15,35
Ska3 1/32000	2,76	-6,97	46,62	-4,36	3,07	38,91	41,75	0,82
Ska 3/16000	2,75	-7,31	49,62	1,79	3,03	37,10	42,65	2,99
Ska 3/8000	3,37	13,84	53,76	10,28	3,84	73,60	42,62	2,91
beta estradiol 1nM	3,07	-1,08	44,94	-5,24	3,41	36,17	47,60	12,59

Tabelul nr.2: Efectul compusilor asupra liniei celulare HaCaT (keratinocite umane imortalizate)

Tabelul 3: Efectul Pa3 asupra statusului colagenului din matricea extracelulara a HS27

	mediu cu nivel normal de estrogeni						mediu fara estrogeni					
	Colagen μg Pro/2*10 ⁵ celule/ml		MMP9		MMP2		Colagen μg Pro/2*10 ⁵ celule/ ml		MMP9 (pixeli)		MMP2 (pixeli)	
		% variatie		% variatie		% variatie		% variatie		% variatie		% variatie
Martor celular	3.007		4.26		16.12		2.771		12.07		43.33	
Martor solvent	1.750		3.92		14.66		1.506		11.32		41.63	
Pa3 1nM	4.724	62.96	4.97	20.52	23.85	38.5	3.585	58	7.12	- 59	35.95	-15.97
Pa3 5nM	4.879	64.13	6.49	39.6	28.86	49.2	4.867	69.06	6.02	-88.04	37.23	-11.82

Pa3 10nM si Ska3 1/8000 stimuleaza rata de proliferare celulara in conditii de depletie estrogenica la nivel de keratinocit, similar cu estrogenul sintetic, β-estradiolul. La nivel de fibroblast, efectul estrogen- mimetic se mentine atat pentru Pa3 (5nM si 10 nM), cat si pentru Ska3 (1/8000 si 1/16000), cele doua principii active demonstrand o actiune concertata la nivelul receptorilor de estrogeni din piele, similara cu produsii de sinteza (beta estradiolul). De asemenea, biocomplexul Pa3 induce asupra celulelor crescute in conditii normale (cu estrogeni), intr-o maniera dependenta de doza aplicata, atat biosinteza colagenului cat si activarea enzimelor proteolitice MMP9 si MMP2, ajutand astfel la remodelarea matriceala corecta a zonei afectata de radiatiile UV prin inlocuirea fibrelor de colagen degradat fara a se produce o acumulare a acestuia. In situatia in care celulele au fost private de estrogeni Pa3 reechilibreaza homeostazia colagenului in conditii de depletie de estrogeni atat prin scaderea drastica a MMP9 cat si prin mentinerea ratei crescute de biosinteza a colagenului.

L. Glinde

[Signature]

BIOTEHNOLOGII
S 25
2

Demonstrarea actiunii Ska3 si Sks2 de restaurare a fermitatii structurilor dermo-epidermice prin inducerea supraexpresiei integrinelor $\alpha1\beta1$ si $\alpha2\beta1$

Integrinele sunt proteine functionale alcatuite din 2 subunitati glicoproteice (α si β) care se extind de-a lungul membranei capabile sa lege multiplii liganzi, printre care si molecule din matrixul extracelular, avand un rol important in adeziunea celulara, miscarea si migrarea celulara. Integrina $\alpha1\beta1$ mediaza feed-back-ul de reglare a sintezei de colagen, realizand legaturi de tip celula –colagen sau celula –lamininal din matrixul extracelular, iar Integrina $\alpha2\beta1$ mediaza stimularea colagenazei de tip I (MMP1) cu rol in fibrilogeneza (organizarea colagenului in fibrile), leaga colagenul de tip I. Balanta intre Integrina $\alpha1\beta1$ si Integrina $\alpha2\beta1$ este importanta pentru mentinerea echilibrului intre degradarea si sinteza de colagen. [10], [11], [12] Tehnica de evidentiere a integrinelor prin citometrie in flux presupune utilizeaza anticorpilor monoclonali pentru lanturile α si β (CD49a, marcat fluorescent pentru PE, corespunzator subunitatii $\alpha2$; CD49b, marcat fluorescent pentru FITC, corespunzator subunitatii $\alpha1$; si CD 29 marcat fluorescent pentru APC, corespunzator subunitatii $\beta1$).

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

	FITC-A Mean (CD 49b - Integrina alfa2)	% de variatie	PE-A Mean (CD 49a - Integrina alfa1)	% de variatie	APC-A Mean (CD 29 -Integrina beta1)	% de variatie
MARTOR	14227,67		5310,67		4077,33	
PG	14526,33		5490,00		4170,33	
TGF beta 4ng/ml	46264,00	225,17	7150,33	12,93	8225,00	97,23
PP4 5ug/ml	12005,00	-15,62	3550,33	-12,37	3475,33	-16,67
PP4 10ug/ml	14077,00	-1,06	4245,33	-7,49	3761,00	-9,82
PP4 16.6ug/ml	14848,00	4,36	3754,67	-10,94	4593,00	10,14
PP4 33ug/ml	11780,33	-17,20	4517,00	-5,58	3996,33	-4,17
PP4 50ug/ml	19722,00	38,62	4925,67	-2,71	3322,33	-20,33
PP4 75ug/ml	19958,67	40,28	5917,67	4,27	5695,33	36,57
PP4 100ug/ml	31404,33	120,73	5846,67	3,77	5409,67	29,72
PP4 150ug/ml	32949,00	131,58	7759,33	17,21	6111,67	46,55
Pa3 5nM	20652,00	45,15	4433,33	-6,17	5025,33	20,50
Pa3 10nM	29194,33	105,19	5601,33	2,04	5922,33	42,01
Ska3 1/8000	30595,33	115,04	7330,33	14,20	5411,67	29,77
Ska3 1/16000	27861,67	95,83	5983,33	4,73	5887,67	41,18
Sks2 1/50000	53028,67	272,72	10082,33	33,54	4442,33	6,52
Sks2 1/60000	60555,67	325,62	10973,67	39,80	4391,00	5,29

Handwritten signatures and a circular stamp with the number 526 are present at the bottom right of the page.

Compusul PP4 (50µg/ml – 150 µg/ml) induce in maniera doza efect expresia lantului glicoproteic $\alpha 2$, la concentratiile superioare avand un efect generalizat in supraexpresia integrinei $\alpha 1\beta 1$ si $\alpha 2\beta 1$.

Ska3 induce preponderent expresia lantului glicoproteic $\alpha 2$, iar Sks2 este cel mai activ dintre compusii analizati in supraexpresia lanturilor $\alpha 1$ si $\alpha 2$, cu efect superior chiar si martorului pozitiv (TGF beta 4ng/ml).

Astfel, se recomanda utilizarea acestor preparate ca ingrediente activi in restabilirea fermitatii tesutului cutanat prin consolidarea legaturilor celula dermica – matrix extracelular.

Demonstrarea activitatii fotoprotectoare fata de radiatia UV-A si UV-B a preparatelor fitoterapice Ska3 si Sks2

In pielea iradiata sunt generate specii de oxigen reactive care produc degradari oxidative la nivelul lipidelor, proteinelor si ADN-ului. Mutatiile la nivel de ADN produc activarea proteinei p53, promotor de apoptoza la nivel de keratinocit, care are ca efect final distrugerea structurii epiteliale. Keratinocitele iradiate elibereaza citokine pro-inflamatorii si induc indirect activarea MMP-1 in fibroblastii dermici. IL1 α are un rol major in propagarea indirecta a acestor efecte.

Astfel, s-a demonstrat actiunea preparatelor **Ska3 si Sks2** in patogeneza fotoimbatranirii printr-un screening al urmatoriilor parametri celulari:

- **Inducerea apoptozei** declansata de modificari la nivel de ADN
- **Stress oxidativ celular** – activarea intracelulara a speciilor de oxigen reactive si a sistemului de conversie enzimatica al acestora: catalaza si superoxide dismutaza (SOD)
- **Status inflamator:** secretia citokinelor pro-inflamatorii (IL6, IL8), a IL1- α ca indicator de sensibilizare si iritabilitate;
- **Secretia factorului VEGF** (vascular endothelial growth factor) – promotor de angiogeneza – etapa cheie in refacerea tesutului cutanat degradat si vindecarea ranilor.
- **Modularea activitatii enzimelor degradative ale matrixului extracelular:** metaloproteinaza 2 si 9 (MMP 2 si 9).

Centralizarea efectelor cumulative care stau la baza fotoprotectiei este prezentata in tabelele de mai jos (comparativ cu martorul pozitiv N actil cisteina 10mM):

Handwritten signatures and a circular stamp.

Stamp: **DIAGNOS**, S/27, 2012

Substanta testata / Efect biologic	Iradiere UV-A													
	Protectie fata de apoptoza				Inhibitie IL1 α (pg/ml)	Inhibitie VEGF (pg/ml)	Inhibitie Citokine inflamatorii		Inhibitie Stress oxidativ			Activare metaloproteinaze MMP 2 si 9		
	% celule vii	% celule apoptice timpurii	% celule apoptice tarzii	% celule necrotice			IL8 (pg/ml)	IL6 (pg/ml)	Mediana canalului de fluorescenta FITC-A (H ₂ O ₂)	Mediana canalului de fluorescenta PE-A (O ₂)	Catalaza UI/10 ⁵ celule/ml		SOD UI/10 ⁵ celule/ml	
					MMP 2	MMP 9								
Martor celular	50,3	34,5	13,6	0,7	361,0	526,5	1416,4	1456,4	10688,0	9448,0	1.6434	595	30.75	57.24
Martor de solvent	46,9	50,2	10,5	1,7	341,5	511,0	1331,5	1463,0	14971,0	11609,3	0.7162	500	38.11	63.01
Ska3 1/4000	34,8	51,3	12,2	1,3	320,6	339,86	906,4	1322,6	11164,0	8634,0	2.015	406	23.94	55.74
Ska3 1/7500	43,3	36,7	16,4	2,6	325,6	356,96	1009,1	1338,8	11565,7	9441,3	1.932	586	27.5	59.78
Sks2 1/25000	48,1	38,3	11,2	2,0	300,0	351,43	1096,5	1480,1	8406,0	8330,0	5.674	378	30.01	59.55
Sks2 1/30000	49,5	33,9	14,9	1,8	328,2	371,52	1179,4	1355,3	9626,0	8776,7	4.687	423	36.52	58.35
N-Acetil Cysteina 10mM	71,1	23,3	5,3	0,2	289,85	320	1058	1208	7896	6254				

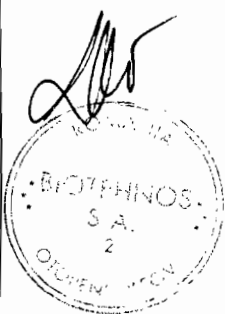


Handwritten signature

28

2-2012-00482/1-
29-06-2012

SUBSTANTA TESTATA / EFECT BIOLOGIC	IRADIERE UV-B										ACTIVARE METALOPROTEINAZE			
	PROTECTIE FATA DE APTOZA				INHIBITIE IL1α (pg/ml)	INHIBITIE VEGF (pg/ml)	INHIBITIE CITOKINE PRO-INFLAMATORII		INHIBITIE STRESS OXIDATIV			MMP	MMP	
	% CELULE VII	% CELULE APTOTICE	% CELULE APTOTICE PURI	% CELULE NECROTICE			IL8 (pg/ml)	IL6 (pg/ml)	MEDIAN A CANALULUI DE FLUORESCENTA FITC-A (H ₂ O ₂)	MEDIAN A CANALULUI DE FLUORESCENTA PE-A (O ₂)	CATALAZA UI/10 ⁵ CELULE/ML	SOD UI/10 ⁵ CELULE/ML	2	9
MARTOR CELULAR	43,9	12,3	34,4	5,9	316,6	723,4	10880,4	6775,6	32820,3	13184,0	0,2494	1,30	33,98	65,16
MARTOR DE SOLVENT	40,0	13,9	38,0	9,5	295,4	666,4	9861,4	6433,5	29950,0	22406,3	0,1248	2,17	38,24	67,38
SKA3 1/4000	35,5	16,7	36,2	13,4	300,9	273,89	8140,4	6733,1	14649,3	20173,0	0,696	1,93	32,45	61,33
SKA3 1/7500	33,7	15,2	38,9	11,6	334,3	313,12	8219,9	6677,8	19161,3	14552,7	0,410	4,03	3528	64,07
SKS2 1/25000	48,7	17,2	26,5	7,8	310,5	342,37	7162,4	4911,1	18587,0	12779,7	0,436	5,56	29,3	59,66
SKS2 1/30000	36,2	16,0	35,7	12,3	319,0	283,26	7912,5	6312,0	20695,7	13504,3	0,235	4,78	36,6	67,85
N-ACETIL CYSTEINA 10mM	69,4	25,2	4,9	0,4	236,61	260	9775	4875	12445	7456				



29
Handwritten signature and initials

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

- **Sks3** – efect protector fata de radiatia UV-A, deci agent anti-imbatranire efectiv, cu actiune complexa atat la nivelul citokinelor inflamatorii si IL1 α , cat si protector fata de inducerea apoptozei; in conditiile iradierii UV-B are doar efect de stopare a inflamatiei si anti-angiogenic, fara a influenta apoptoza;
- **Ska2** - nu influenteaza inducerea apoptozei, dar are efect anti-inflamator pe ambele tipuri de iradiere, completat in cazul UV-B si de efectul antiangiogenic

Demonstrarea activitatii antiinflamatoare la nivel de endoteliu vascular a preparatului fitoterapic Pa3

Cresterea si turnoverul celulelor endoteliale in piele este fundamentala nu numai in cadrul dezvoltarii normale, dar si in vindecarea ranilor, ciclul foliculilor pilosi, metastaza celulelor tumorale, si a diferitelor stadii ale patologiei cutanate. Exista mai multe aspecte privind fiziologia vasculaturii dermice si implicarea acesteia in homeostazia tesutului cutanat. Dintre acestea inflamatia vasculara este cel mai important aspect, caracterizat de adeziunea intre limfocit si endoteliu declansata de exprimarea unor molecule de adeziune –markeri de inflamatie si secretia de citokine pro-inflamatorii. [13]

A fost determinat pe linia endoteliala HUVEC **efectul antiinflamator la nivel vascular** al preparatului Pa3, cu urmatoarea aplicabilitate: **In cadrul efectului antiageing – anti-fotoimbatranire**, in procesul de combatere a inflamatiei si cicatrizare a leziunilor provocate de radiatia UV(model experimental de stimulare cu TNF- α , 2ng/ml – stimul inflamator general) ; **in cadrul efectului antiacneic**, cunoscuta fiind infectia bacteriana si inflamatia in zonele afectate (model experimental de stimulare cu LPS 1 μ g/ml – stimul inflamator de origine bacteriana). Celulele au fost lasate sa adere 24h, apoi tratate 48h. cu substantele testate. Evaluările s-au facut comparativ cu un **martor pozitiv de Dexamethazona**, un agent antiinflamator cunoscut, in concentratie de 0.6 μ g/ml. [14]

S-a evaluat expresia proteica a VCAM-1 SI ICAM-1 prin citometrie in flux: (marcare fluorescanta cu anticorpii corespunzatori pentru ICAM-1 respectiv VCAM-1, **APC Mouse Anti-Human CD54 pentru evidentierea ICAM-1 (intracellular-adhesion molecule si PE-Mouse Anti-Human CD106 pentru evidentierea VCAM-1 (vascular-cell-adhesion molecule)**). Rezultatele se analizeaza comparandu-se media canalului de fluorescanta APC, respectiv PE pentru probele achizitionate. Rezultatele au fost comparate cu secretia

27 giulie
30 A
2
BIOTEHNIKOS
30 A
2
SECRETARIA

citokinelor inflamatorii umane exprimate in pg/ml (**marcarea si analiza cu kitul BD Cytometric Bead Array (CBA)- Human Inflammatory Cytokines kit (BD Pharmingen).**)

Rezultatele sunt prezentate in tabelele de mai jos:

Substanta testata	celule nestimulate				celule stimulate LPS 1ug/ml				celule stimulate TNF alfa 2ng/ml			
	ICAM (media canal fluorescent)	% variatie	VCAM (media canal fluorescent)	% variatie	ICAM (media canal fluorescent)	% variatie	VCAM (media canal fluorescent)	% variatie	ICAM (media canal fluorescent)	% variatie	VCAM (media canal fluorescent)	% variatie
Martor celular	10882,6		1366,9		13974,4	28,4	1287,0	-5,8	15697,5	44,2	1569,7	14,8
Pa3 20nM	12036,1	10,6	1307,2	-4,4	13239,8	-5,3	1185,6	-7,9	12968,1	-17,4	1610,7	2,6
Pa3 10nM	11857,3	9,0	1244,7	-8,9	12660,0	-9,4	1278,5	-0,7	15834,3	0,9	1159,6	-26,1
Pa3 5nM	12115,3	11,3	1281,8	-6,2	12380,5	-11,4	1271,4	-1,2	16371,2	4,3	1161,5	-26,0
Dexametazona 0,6 ug/ml	10235,8	-5,9	1339,6	-2,0	11097,4	-20,6	1406,6	9,3	17095,0	8,9	1131,0	-27,9

Substanta testata	celule nestimulate				celule stimulate LPS 1ug/ml				celule stimulate TNF alfa 2ng/ml			
	IL6	% variatie	IL8	% variatie	IL6	% variatie	IL8	% variatie	IL6	% variatie	IL8	% variatie
Martor celular	2054,5		1446,6		8166,1	297,5	4819,5	233,2	8543,4	315,8	5547,2	283,5
Pa3 20nM	7694,8	274,5	5161,7	256,8	6677,5	-18,2	4176,0	-13,4	6115,2	-28,4	4117,5	-25,8
Pa3 10nM	6512,4	217,0	4234,6	192,7	4135,7	-49,4	3042,0	-36,9	8810,5	3,1	5137,0	-7,4
Pa3 5nM	7550,4	267,5	4507,0	211,6	4049,1	-50,4	3129,9	-35,1	8411,6	-1,5	5124,7	-7,6
Dexametazona 0,6ug/ml	3823,7	86,1	1542,8	6,6	2215,0	-72,9	1100,2	-77,2	3218,5	-62,3	1379,9	-75,1

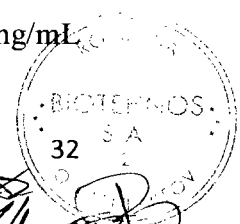
Compusul Pa3 este un bun agent anti-inflamator in conditiile inflamatiei bacteriene (model experimental de stimulare cu LPS- polizaharid obtinut din Escherichia coli), actionand invers doza – efect in intervalul de concentratii 20nM-5nM, atat in sensul inhibarii expresiei moleculei de adeziune ICAM, cat si al reducerii secretiei IL6 si IL8, in special IL6. Aceast efect recomanda utilizarea ca antiinflamator in tratamentul antiacneic, evitand cronicizarea inflamatiei (inhiba IL6). **In cadrul efectului antiageing – anti-fotoimbatranire**, in procesul de combatere a inflamatiei si cicatrizare a leziunilor provocate de radiatia UV- (model experimental de stimulare cu **TNF- α**), compusul Pa3 actioneaza simultan asupra ICAM si a citokinelor IL6 si IL8 stopand progresia inflamatiei.

Demonstrarea activitatii antimicrobiene a preparatelor fitoterapice Ska3 si Sks2

Colonizarea microbiana reprezinta unul dintre evenimentele esentiale care stau la baza patogenezei acneei. In culturile microbiene dezvoltate în condiții de aerobioză din leziuni cutanate pustulare și nodulochistice au fost izolate urmatoarele microorganisme: *Staphylococcus aureus* în 41% din cazuri, *S. epidermidis* în 53% și *Micrococcus spp.* în 45%, în timp ce din culturile anaerobe s-au izolat *S. aureus* în 39% din cazuri, *Propionibacterium acne* în 33% și *S. epidermidis* în 21%.(Hassanzaadeh et al., 2007) Pentru evidentierea efectului antimicrobial s-au ales ca microorganisme model 36 de specii aparținând genului *Staphylococcus*, evaluându-se potențialul antipatogenic al compusilor Ska 3 si Sks2 după următoarele obiective:

1. Izolarea în cultură pură a unor microorganisme din specimene clinice de tip leziuni cutanate.
2. Testarea calitativă a activității antimicrobiene – metoda difuzimetrică adaptată (tehnica de lucru în spot).
3. Determinarea concentrației minime inhibitorii – metoda microdiluțiilor seriale binare
4. Evaluarea influenței asupra capacității de aderență la substrat inert – metoda microtitrării cu evaluarea spectrofotometrică a biomasei

La testarea calitativa prin metoda difuzimetrica s-a evidentiat prezenta unei inhibatii a cresterii microbiene la nivelul spotului de extract depus pe mediul de cultura insamantat. Metoda nu permite o apreciere semicantitativa a activitatii antimicrobiene datorita profilului de difuziune necunoscut prin mediul de cultura al compusilor. S-a determinat Concentratia minima inhibitorie (CMI) pentru Sks2 de 8.12 mg/mL pentru *S. aureus*, respectiv de 8.12 mg/mL pentru *S. epidermidis*, iar pentru Ska3 de 0.08 mg/mL pentru *S. aureus*; respectiv 0.04 mg/mL

L. G. I. I. I.
[Signature]


pentru *S. epidermidis*. Pe de alta parte, Ska3 nu influențează semnificativ expresia factorilor de virulență pentru tulpinile studiate (*S. aureus* și *S. epidermidis*). Sks2 inhiba capacitatea de aderență la substrat inert a microorganismelor studiate.

In concluzie, compusii Sks2 si Ska3 ar putea reprezenta o solutie in tratamentul antiacneic adjuvant, manifestând un efect antimicrobian asupra unor tulpini implicate in patogenitatea acestei boli.

Rezultatele obtinute in urma studiilor de actiune specifica „in vitro” realizate pe linii celulare standardizate sustin utilizarea componentelor cosmetic active obtinute prin valorificarea completa a plantei *Trigonella Foenum Graecum* in formulari de produse cosmetice dezvoltate pe baza proprietatilor estrogen mimetice, antiinflamatoare, antimicrobiene, fotoprotectoare fata de radiatia UV_A si UV_B ale acestora


EXEMPLE DE CONDITIONARE A COMPONENTELOR BIOLOGIC ACTIVE DIN TRIGONELLA FOENUM GRAECUM

Exemplul de realizare nr. 2 : Produs dermatocosmetic, conținand ca substanțe biologice active produsul fitoterapic PP4 1,00÷10,00% si produsul fitoterapic U1 0,50÷2,00%, condiționat sub formă de cremă de zi, utilizabil în terapia tesutului cutanat imbatranit.

Formula de conditionare:

Formula cantitativa (INCI)

Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate	1,00÷4,00 g/g %
Glyceryl Stearate	0,50÷2,00 g/g %
Stearyl Alcohol	0,80÷1,00 g/g %
Cetearyl Isononanoate	0,50÷5,00 g/g %
Caprylic/capric tryglyceride	1,00÷5,00 g/g %
Isopropyl Palmitate	1,00÷5,00 g/g %
Mineral oil	1,00÷5,00 g/g %
Pentylene glycol	0,50÷5,00 g/g %
Squalane	0,50÷6,00 g/g %
Glycerin	3,00÷5,00 g/g %
Water	Ad.100
Carbomer	0,10÷0,60 g/g %
Sodium Hydroxide	0,03÷0,05 g/g %

Stilinta
 to


Trifolium pratense extract	0,5÷5,00 g/g %
Trigonella foenum graecum extract(PP4)	1,00÷10,00 g/g %
Trigonella foenum graecum extract(U1)	0,50÷2,00 g/g %
Parfum	0,05÷0,40 g/g %
Butylated hydroxyanisole	0.01÷0,10 g/g %

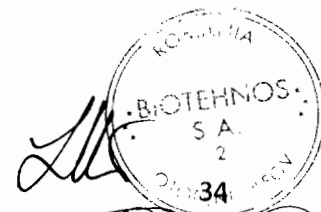
Datorita fitocompusilor biologic activi cu efecte complementare, produsul dermatocosmetic prezinta actiune „estrogen-mimetica”, stimuleaza rata de proliferare celulara si sinteza de colagen prezinta efect fotoprotector fata de UV-A si UV-B prin activitatea anti-inflamatoare si antioxidanta, (Extractul de Trifolium pratense), restabileste fermitatea si hidratarea tesutului dermo-epidermic (compusii PP4 si U1), fiind recomandat cu precadere pentru grupa de varsta peste 45 de ani in terapia anti ageing , sub forma de crema de zi .

Exemplul de realizare nr.3: Produs dermatocosmetic, conținand ca substanță biologic activă **produsul fitoterapeutic Pa3 0.01%÷0.5%**, condiționat sub formă de cremă de noapte, utilizabil în terapia tesutului cutanat imbatranit(consumatori tinta: persoane cu varsta peste 45 de ani):

Formula de conditionare:

Formula cantitativa (INCI)

Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate	1.00÷3.00 g/g %
Glyceryl Stearate	2.00÷5.00 g/g %
Stearyl Alcohol	1.00÷2.00 g/g %
Cetearyl Isononanoate	1.00÷5.00 g/g %
Caprylic/capric tryglyceride	3.00÷5.00 g/g %
Isopropyl Palmitate	1.00÷5.00 g/g %
Pentylene glycol	3.00÷4.00 g/g %
Squalane	3.00÷5.00 g/g %
Dimethylisorbide	1.00÷3.00 g/g %
Octyl methoxycinnamate	1.00÷3.00 g/g %
Bisabolol	0.10÷0.20 g/g %
Corylus avellana extract	0,10÷1,00 g/g %
Crataegus monogyna extract	0,10÷1,00 g/g %



Handwritten signatures and initials at the bottom of the page.

Trigonella foenum graecum extract(Pa3)	0.01÷0.50 g/g %
Carbomer	0.15÷0.50 g/g %
Sodium Hydroxide	0.15÷0.40 g/g %
Mineral oil	3.00÷8.00 g/g %
Parfum	0.05÷0.40 g/g %
Phenoxyetanol(and)Potasium sorbat	0.60÷1.00 g/g %
Butylated hydroxyanisole	0.01÷0.20 g/g %
Disodium EDTA	0.05÷0.10 g/g %
Water	Ad.100 g/g %

Datorita fitocompusilor biologic activi cu efecte complementare, produsul dermatocosmetic prezinta actiune „estrogen-mimetica” de tip „retard”, stimuleaza turn-overul celular, prezinta activitate anti-inflamatoare la nivelul micro-vasculaturii (compusul Pa3 si Ska3), efect fotoprotector fata de UV-A si UV-B si anti-angiogenic (stopeaza formarea de microvasculatura fragila si sinuoasa, iar pe de alta la aparitia eritemelor datorate arsurilor superficiale) prin actiunea concertata a compusilor Ska3, extractului de alun si de paducel, fiind recomandat cu precadere pentru grupa de varsta peste 45 de ani in terapia anti ageing , sub forma de crema de noapte.

Exemplul de realizare nr. 4: Produs dermatocosmetic, conținand ca substanțe biologice active produsul fitoterapeutic PP4 1,50÷15,00 % si U1 1÷3,00 %, condiționat sub formă de masca antiageing, utilizabil în terapia tesutului cutanat imbatranit:

Formula de conditionare:

Formula cantitativa (INCI)	g/g %
Aqua	Ad.100
Potassium Cethyl Phosphate	3,00÷5,00
Lanolin	1,00÷2,00
Trigonella foenum graecum extract(U1)	1,00÷3,00
Petrolatum	3,00÷5,00
Hydrogenated Coco-Glycerides	1,00÷6,00
Caprylic/Capric/Stearic Triglyceride	3,00÷5,00
Caprylic/Capric Triglyceride	3,00÷5,00
Cetyl Alcohol	1,00÷4,00

The bottom right of the page contains several handwritten signatures and a circular official stamp. The stamp is from BIOTEHINOS S.A. and includes the number 352.

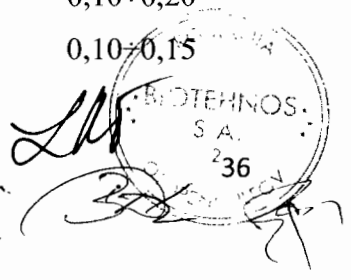
PEG-9 Stearate	5,00÷10,00
Glycerin	2,00÷6,00
Cholesterol	1,00÷4,00
Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone/Vinyldimethicone Crosspolymer	0,50÷1,50
Phenoxyethanol (and) Potasium sorbate	0,60÷1,00
Isopropyl Miristate	1,50÷5,50
Allantoin	0,10÷0,50
Parfum	0,10÷0,15
Tocopheryl Acetate	0,10÷0,50
Butylated hydroxyanisole	0,01÷0,10
Trifolium pratense extract	0,80÷6,00
Trigonella foenum graecum extract(PP4)	1,50÷15,00
Medicago sativa extract	0,50÷6,00
Lavandula officinalis extract	0,50÷6,00
Trigonella foenum graecum extract (U1)	1÷3,00

Produsul dermatocosmetic prezinta o actiune rapida de accelerare a ratei de proliferare celulara (extractul de Trifolium pratense), hidratare intensa (efect indus de PP4 si potentat de U1), anti-irritativa si anti-oxidanta (extract de Albastrele si agliconi triterpenici din Tinctura de Lavanda), fiind recomandat in terapia anti ageing , sub forma de masca profesionala.

Exemplul de realizare nr. 5: Produs dermatocosmetic, conținand ca substanță biologic activă produsul fitoterapeutic Sks2 0.01÷0.10%, condiționat sub formă de lotiune antiageing, utilizabil în terapia tesutului cutanat imbatranit:

Formula de conditionare:

Formula cantitativa (INCI)	g/g %
Aqua	Ad 100
Alcohol	3,00÷7,00
Phenoxyethanol(and) Potasium sorbate	0,50÷1,00
Pentylene Glycol	1,00÷5,00
PPG-26-Buteth-26 (and) PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	1,00÷3,00
Glicerine	1,00÷5,00
Allantoin	0,10÷0,20
Sodium Hydroxide	0,10÷0,15

Stylent 

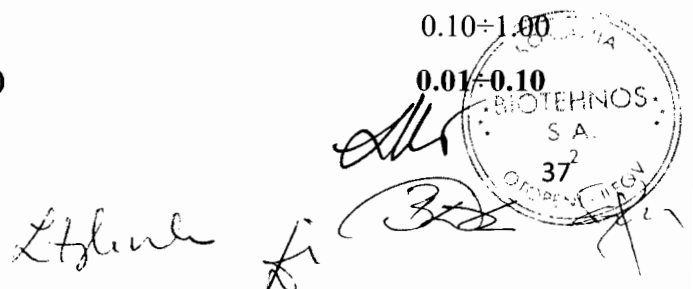
Parfum	0,05÷0,10
Corylus avellana extract	0,10÷1,00
Viola tricolor extract	0,10÷1,00
Centaurea cyanus extract	0,10÷1,00
Trigonella foenum graecum extract (Sks2)	0,01÷0,10
Disodium EDTA	0,01÷0,05

Produsul dermatocosmetic prezinta o actiune anti-iritativa, anti-oxidanta si antimicrobiana (extract de Albastrele, alun si trei frati patati), combinata cu efect fotoprotector UV-A si moderat UV-B (actiunea concertata a extractelor de Albastrele si trei frati patati si compusul Sks3), fiind recomandat in terapia anti ageing , sub forma de lotiune.

Exemplul de realizare nr. 6: Produs dermatocosmetic, conținand ca substanță biologic activă produsul fitoterapic Sks2 **0.01÷0.10%**, condiționat sub formă **de crema de zi pentru ten normal**, destinata prevenirii fenomenelor de foto-imbatranire:

Formula de conditionare:

Formula cantitativa (INCI)	g/g %
Glyceryl Stearate	1.50÷4.50
Stearyl Alcohol	1.50÷3.00
Cetearyl Ethylhexanoate	4.80÷8.00
Ethylhexyl Palmitate	3.00÷5.00
Caprylic/Capric Triglyceride	3.00÷5.00
Decyl Cocoate	0.20÷5.00
Cetearyl Glucoside	0.50÷4.00
Glycerin	3.00÷5.00
Aqua	Ad 100
Carbomer	0.10÷0.40
Cetearyl Ethylhexanoate	0.40÷2.00
Sodium Hydroxide	0.05÷0.10
Dimethicone PEG-8 Meadowfoamate	1.00÷5.00
Phenethyl Alcohol and Caprylyl Glycol	0.50÷1.00
Triticum aestivum extract	0.10÷1.00
Trigonella foenum graecum extract(Sks2)	0.01÷0.10




Butylated hydroxyanisole	0.01÷0.05
Disodium EDTA	0.01÷0.10

Produsul dermatocosmetic prezinta o actiune rapida de regenerare epidermala (extractul de tarate de grau), de mentinere a fermitatii structurilor dermo-epidermice (efect indus de Sks3), fotoprotectoare UV-A (extract de Tarate de grau si Sks3), fiind recomandat cu precadere ca produs de preventie a fenomenelor de foto-imbatranire in cadrul gamei de ingrijire a tenului normal, sub forma de crema de zi.

Exemplul de realizare nr. 7: Produs dermatocosmetic, conținand ca substanță biologic activă produsul fitoterapic Pa3 0.01÷0.50%, condiționat sub formă de crema de zi anti-acneica, utilizabil în terapia formatiunilor acneice prin modulare fito-hormonala si antimicrobiana:

Formula de conditionare:

Formula cantitativa (INCI)	g/g %
Aqua	Ad.100
Stearic acid	3.50÷5.00
Cetyl alcohol	3.00÷5.00
Hydrogenated Coco-Glycerides	2.00÷5.00
Glyceryl Stearate	1.00÷5.00
Caprylic/Capric Triglyceride	2.00÷5.00
Isopropyl Miristate	2.00÷5.00
Lanolin	1.00÷3.00
Potassium Cetyl Phosphate	1.00÷3.00
Simmondsia Chinensis Oil	1.00÷3.00
Glycerin	2.00÷5.00
Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone/Vinyldimethicone Crosspolymer	1.00÷3.00
Polysorbate 80	1.00÷3.00
Cera Alba	0.25÷2.00
Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Butylparaben (and) Ethylparaben	0.60÷1.00

Stilina


(and) Propylparaben

Allantoin 0.10÷0.50

Tocopheryl Acetate 0.10÷0.50

Parfum 0.10÷0.40

Trietanolamina 0.10÷0.50

Trigonella foenum graecum extract(Pa3) 0.01÷0.50

Corylus avellana extract 0.10÷1,00

Arctium lappa extract 0.10÷1.00

Butylated hydroxyanisole 0.01÷0.05

Disodium EDTA 0.01÷0,05

Bisabolol 0.10÷0.30

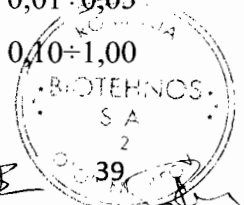
Produsul dermatocosmetic prezinta o actiune rapida de modulare fito-hormonala (compusul Pa3), anti-microbiana si anti-oxidanta (extract de Brusture si Alun), (agliconi triterpenici din Tinctura de Lavanda), anti-inflamatoare la nivel de micro-vasculatura (extract de Brusture), fiind recomandat cu precadere pentru terapia antiacneica , sub forma de crema de zi.

Exemplul de realizare nr. 8: Produs dermatocosmetic, conținand ca substanță biologic activă produsul fitoterapic Ska2 0,03÷0,15%, condiționat sub formă de lotiune antiacneica, utilizabil în terapia **formatiunilor acneice** prin modulare fito-hormonala si antimicrobiana:

Formula de conditionare:

Formula cantitativa (INCI)

	g/g %
Aqua	Ad 100
Alcohol	6,00÷10,00
Phenoxyethanol(and) Potassium sorbate	0,50÷1,00
Pentylene Glycol	1,00÷5,00
Glicerine	1,00÷5,00
Allantoin	0,10÷0,20
Sodium Hydroxide	0,10÷0,15
Parfum	0,05÷0,10
Menthol	0,01÷0,05
Viola tricolor extract	0,10÷1,00



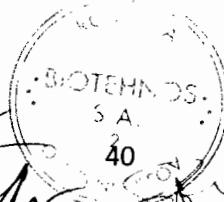
Handwritten signature

Handwritten signatures and initials

Centaurea cyanus extract	0,10÷1,00
Trigonella foenum graecum extract(Ska3)	0,03÷0,15
Arctium lappa extract	0,50÷2,00
Disodium EDTA	0,01÷0,05


Produsul dermatocosmetic prezinta o actiune de modulare hormonala in conditii de dezechilibru estrogenic (compusul Ska3), anti - microbiana(extract de Albastrele, trei frati-patati si compusul Ska3), anti-iritativa si anti-oxidanta (extract de Albastrele, trei frati-patati), anti-inflamatoare la nivel de micro-vasculatura (extract de Albastrele) si foto-protectoare (actiune cumulativa a compusului Ska3 si extractelor de albastrele si trei frati patati), fiind recomandat cu precadere pentru terapia antiacneica , sub forma de lotiune.

Hlinh *St* *3* *all* *g*



BIBLIOGRAFIE

1. Verdier –Sevrain S, Bonte F., Gilcrest B; , Experimental Dermatology 2006: 15:83-94;
- 2.. Raine-Fenning NJ, Brincat MP, Muscat-Baron Y; Am J Clin Dermatolog 2003; 4(6):371-8 ;
3. Wen-Chieh Chen and Christos C. Zouboulis, Dermatoendocrinol. 2009 Mar-Apr; 1(2): 81–86;
4. Christos C. Zouboulis Sebaceous gland receptor - Dermato-Endocrinology 1:2, 81-86; March/April 2009;
5. Nichols JA, Katiyar SK;Arch.Dermatol.Res.2010 Mar;30(2);71-83;
6. T.Bombelli; Phytotherapy Res. 2003;17; 987;
7. Nappez si colab. “Cancer Lett” vol.4, 1995, pag.133-140,
8. Peana si colab. “Planta Med. ,63., 199-202 (1997)
9. Yayoi Tada, Naoko Kanda, Akinori Haratake, Megumi Tobiishi, Hideyo Uchiwa and Shinichi Watanabe ; Steroid;74 (6):504-11 (2009).;
10. Riikonen T, Westermarck J, Broberg A, Kahari VM, Heino J (1995). J Biol Chem 270:13548–13552
11. Zhang Z, Bothe I, Hirche F, Zweers MC, Gullberg D, Pfitzer G et al. (2006). J Cell Sci 119:1886–1895
12. Fujimura T, Moriwaki S, Imokawa G, Takema Y., ,J Dermatol Sci. 2007 Jan;45(1):45-53. Epub 2006 Nov 21.
13. G Haraldsen, D Kvale, B Lien, IN Farstad and P Brandtzaeg, Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells - Labortory for Immunohistochemistry and Immunopathology (LIPAT), Institute of Pathology, The National Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway.
14. WenChieh CHEN, J. Yu-Yun LEE, Wen-Chuan HSIEH European Journal of Dermatology. Volume 12, Number 5, 445-8, September - October 2002



REVENDICARI

1. compus lipofil, sub forma unui lichid galben, usor opalescent caracterizat prin aceea ca are un continut standardizat in acizi grasi mono si polinesaturati ω -3 si ω -6 componenti ai vitaminei F de min.80%, denumit **U1**, obtinut in cantitate de 3-5 g/100 g materie prima uscata prezentand urmatoarele actiuni:

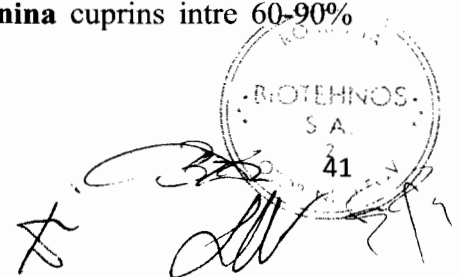
- refacere naturala a nivelului de hidratare al pielii, a homeostaziei hidro-lipidice epidermale, prin continutul in **acizi grasi polinesaturati** (oleic si linoleic), constituinti ai membranelor celulare
- efect anti-inflamator al acidului linoleic, ca precursor de prostaglandina

2. extract selectiv caracterizat prin aceea ca poate fi conditionat fie in glicerina, propilenglicol, butilenglicol sub forma unui lichid brun roscat limpede, cu miros caracteristic, standardizat in saponine steroidice totale de min.1% si compusi flavonoidici de min.0,15g /100 mL, denumit (**SKs2**), obtinut in raport 1:1- 3:1 materie prima vegetala:extract; sau sub forma de pulbere portocalie, cu un continut in saponine steroidice totale de min.8% si compusi flavonoidici de min.1,0 g/100 g obtinut in cantitate de min.8 g/100 g seminte, denumit Ps2 prezentand urmatoarele actiuni:

- accelerarea metabolismului celular al fibroblastilor dermici (sinteza de ATP)
- efect protector fata de radiatia UV-A, deci agent anti-imbatranire efectiv, cu actiune complexa atat la nivelul citokinelor inflamatorii si IL1 α (stopare a iritatiilor cutanate), cat si protector fata de inducerea apoptozei; in conditiile iradierii UV-B are efect de stopare a inflamatiei si anti-angiogenic, fara a influenta apoptoza;
- actiune anti-microbiana moderata
- efect antioxidant prin reducerea producerii intracelulare de apa oxigenata

3. extract selectiv caracterizat prin aceea ca poate fi conditionat fie in glicerina, propilenglicol, butilenglicol standardizat in agliconi steroidici totali 0,2-0,3% din care diosgenina 0,1-0,15% si in compusi polifenolici exprimati in acid cafeic de 0,15-0,2% obtinut in raport 1:1-3:1 materie prima vegetala:extract, denumit **Ska3**; fie compus steroidic brut, sub forma de pulbere cafenie, cu un continut in aglicon steroidic total de 8-15% obtinut in cantitate de minm 2 g/100 g materie prima denumit **Pa3**, din care prin operatii succesive de purificare se obtine produsul purificat cu un continut in **diosgenina** cuprins intre 60-90% prezentand urmatoarele actiuni:

L. Hlinch



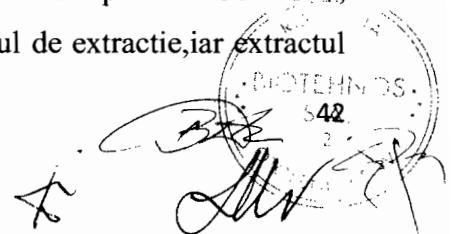
- actiune estrogen mimetica in ceea ce priveste proliferarea celulara si sinteza de colagen
- actiune dermo-restitutiva, prin efecte concertate la nivelul stimulării proliferării celulare si a sintezei de colagen si al inducerii supraexpresiei integrinelor $\alpha_2\beta_1$ cu rol in fibrilogeneza si formarea legaturilor celula – matrice extracelulara (colagen)
- actiune fotoprotectoare fata de radiatia UV_A si UV_B prin reducerea inflamatiei, completat in cazul UV-B si de efectul antiangiogenic
- actiune anti-inflamatoare la nivel vascular (pentru Pa3)
- actiune anti-microbiana

4. complex bioactiv polizaharidic cu structura de **galactomanani**, sub forma unei pulberi fine, gri-cafenii, caracterizat prin aceea ca are un continut standardizat in fibre solubile in apa de min.85%, obtinut in cantitate de minim 20 g /100 g materie prima , denumit **PP4**;

5. ingrasamant verde, constituit din materia prima din care au fost extrase componentele dermato-cosmetic active, ce se recicleaza sub forma de compost prin incorporarea in aratura din sol.

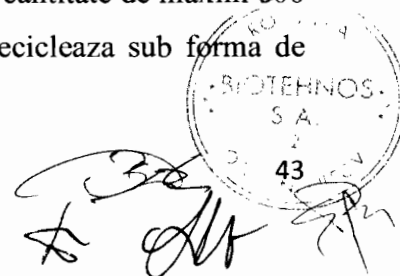
6. Procedeu de obtinere a produselor fitoterapeutice dermato-cosmetice definite in revendicarile 1-5 caracterizat prin aceea ca tehnologia valorifica la nivel industrial intregul potential terapeutic si nutritional al materiei prime vegetale, dupa recoltarea semintelor planta uscata si macinata, se foloseste ca nutret pentru animale, iar semintele devin materie prima in industria cosmetica fiind supuse aceluasi flux de extractie , se extrag succesiv in trei trepte, in raport 1:5-1:10 cu acetona timp de 1-2 ore/treapta in instalatia de extractie, la temperatura de 18-25°C solutiile extractive obtinute se supun operatiilor de concentrare sub vid la 30- 40°C, pentru recuperarea solventului, reintroducerea acestuia in sistemul de extractie si obtinerea extractului brut uleios, care se supune purificarii prin filtrare si distilare inaintata sub vid pentru eliminarea urmelor de apa si solvent de extractie, rezultand uleiul purificat de schinduf in cantitate de 30-70 g/kg planta cu un continut in acizi grasi esentiali mono si polinesaturati, ω -3 si ω -6 componenti ai vitaminei F de min.80% iar materia prima existenta deja in vasul de extractie se extrage in continuare cu alcool etilic 80-96% de calitate farmaceutica, in trei trepte, in raport 1:8-1:12, timp de 1-2 ore/treapta, la temperatura de 18-25°C, solutiile extractive obtinute se supun concentrării sub vid la temperatura 30- 40°C, pentru recuperarea solventului si reintroducerea acestuia in sistemul de extractie, iar extractul

L. Hinc



concentrat este prelucrat prin conditionare in propilenglicol, glicerina sau butilenglicol, solventi cosmetic admisi, in raport de 2:1 materie prima: preparat final, cu obtinerea preparatului SKs2 sub forma unui lichid brun roscat limpede, cu miros caracteristic, standardizat in saponine steroidice totale de min.1% si compusi falvonoidici de min.0,15g/100 mL, fie solutiile extractive obtinute se usuca prin concentrare sub vid iar produsul obtinut se suspenda in acetona pentru separarea compusilor steroidici glicozidati de oleorezinele existente in extract, obtinandu-se produsul Ps2 sub forma de pulbere portocalie, cu un continut in saponine steroidice totale de min.8% obtinut in cantitate de min.8 g/100 g seminte iar materia prima ramasa in vasul de extractie dupa etapa a doua se extrage cu solutii hidroetanoliche cu o concentratie cuprinsa intre 40-70%, cel mai bine 60% de calitate farmaceutica, in raport 1:12-1:15, in trei trepte, timp de 2 ore/treapta, la temperatura de 18-25°C, solutiile extractive obtinute se supun concentrarii sub vid la 30-40°C, recuperarii solventului si reintroducerii acestuia in proces; extractul concentrat apos obtinut ce se gaseste in instalatia de concentrare se supune operatiei de hidroliza acida cu HCl 2N, sub vid, la 40-50°C, timp de 1 ora; extractul obtinut se neutralizeaza se filtreaza si se usuca obtinand preparatul brut in cantitate de minm 20 g/kg materie prima vegetala sub forma de pulbere brun-cafenie cu un continut in aglicon steroidic de 8-15% exprimat in diosgenina din care prin purificari succesive se obtine preparatul purificat Pa3 cu un continut in diosgenina cuprins intre 60-90% in functie de utilizari; pentru a obtine preparatul sub forma de extract fluid pulberea obtinuta se dizolva in alcool etilic 96% sub vid, la reflux timp de 1 ora si apoi se prelucreaza prin includerea intr-un solvent cosmetic:propilenglicol, glicerina, butilenglicol, in raport 1:1 materie prima: preparat final, denumit Ska3 standardizat in agliconi steroidici totali de 0,2-0,3% si diosgenina de 0,1-0,15%; extractia complexului bioactiv polizaharidic cu structura de galactomanani, se realizeaza prin extractia materiei prime ramasa in vasul de extractie dupa etapa a treia, cu apa purificata incalzita la 30-60 grade Celsius, in raport 1:25-1:50, in trei trepte, timp de 1 ora/treapta, solutiile extractive obtinute se racec la temperatura ambianta si sunt supuse precipitarii, in raport 2:1 alcool etilic farmaceutic 80-96% : extract polizaharidic v/v; amestecul astfel obtinut este mentinut la 4-8°C minim 4 ore; precipitatul alb cu aspect de fuior obtinut se separa prin filtrare sub vid si se usuca in curent de aer cald la 60-70 grade Celsius, obtinandu-se preparatul PP4 sub forma unei pulberi fine, gri-cafenii, cu un continut standardizat in fibre solubile in apa de min.85%, obtinut in cantitate de minim 200 g /kg materie prima iar materia prima vegetala reziduala, ce se obtine in cantitate de maxim 600 g/kg materie prima initiala, epuizata in componentele urmarite, se recicleaza sub forma de compost, prin incorporarea in aratura din sol.

L. Ghinea



7. Produse dermatocosmetice, conținând ca substanță biologic activă produsele fitoterapice PP4, U1, Sks3, Pa3, Ska2 definite în revendicarea 1-4, condiționate sub formă de cremă, masca sau lotiune, care conțin **0.01÷0.50%** Pa3, **0.01÷0.10%** Sks2, **1,50÷15,00%** PP4, **1,00÷3,00%** U1, fiind aplicabile în terapia tesutului cutanat imbatranit.

8. Produse dermatocosmetice, conținând ca substanță biologic activă produsele fitoterapice definit în revendicarea 3, condiționat sub formă de cremă sau lotiune, care conțin **0.01÷0.50%** Pa3; **0,03÷0,15%** Ska3, fiind aplicabile în **terapia formatiunilor acneice** prin modulare fito-hormonala si antimicrobiana.


Circular stamp: BOTECHINOS S.A.
Handwritten signature: [Illegible]