



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00482**

(22) Data de depozit: **29/06/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/12/2016** BOPI nr. **12/2016**

(41) Data publicării cererii:  
**30/10/2013** BOPI nr. **10/2013**

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

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

• **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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**EP 1900356 A1; WO 2009153800 A1**

(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**



1 Prezenta invenție se referă la un procedeu tehnologic unitar, aplicabil în industria far-  
maceutică și cosmetică, prin care se valorifică integral componentele biologic active ale plan-  
3 tei *Trigonella foenum graecum*, ce presupune extracția selectivă în trepte, separarea compo-  
nentelor farmaceutic și cosmetic active, cu reciclarea materiilor vegetale și a resurselor utili-  
5 zate, precum și condiționarea extractelor obținute în produse cosmetice cu acțiune estrogen  
mimetică antiinflamatoare, antimicrobiană și fotoprotectoare, destinate terapiei antiîmbă-  
7 trânire și antiacneice.

Procedeul de obținere a extractelor din *Trigonella foenum graecum semen* (semințe  
9 de schinduf) constă în extracția succesivă și selectivă în patru trepte, rezultând extractul  
lipofil standardizat în acizi grași mono- și polinesaturați  $\omega$ -3 și  $\omega$ -6, extractul steroidic glico-  
11 zidat standardizat în saponine steroidice totale și compuși flavonoidici, extractul steroidic  
neglicozidat standardizat în agliconi steroidici totali, și extractul polizaharidic cu structură de  
13 galactomanani cu un conținut standardizat în fibre solubile.

Produsele cosmetice conform invenției conțin, ca substanțe biologic active, extractele  
15 obținute din *Trigonella foenum graecum semen*, individual sau asociate în diferite combinații  
și proporții, și anume: 0,5...3% extract lipofil și/sau 0,01...5% extract steroidic glicozidat  
17 și/sau 0,01...1% extract steroidic neglicozidat și/sau 1...15% extract polizaharidic, alături de  
alte ingrediente cosmetice, condiționate sub formă de creme, măști și loțiuni, care, prin acțiu-  
19 nile „estrogen-mimetică”, de stimulare a ratei de proliferare celulară și a sintezei de colagen,  
de modulare fitohormonală în condiții de dezechilibru estrogenic, fotoprotectoare față de UV-  
21 A și UV-B, antimicrobiană, antiiritativă, antioxidantă, antiinflamatoare la nivel microvascular  
și de restabilire a fermității și hidratării țesutului dermo-epidermic a extractelor componente,  
23 pot fi utilizate cu precădere în prevenția și terapia antiîmbătrânire și antiacneică.

Conform prezentei invenții, variantele de condiționare a componentelor active, sub  
25 formă de produse cosmetice dezvoltate pe baza proprietăților estrogen mimetice, antiinfla-  
matoare, antimicrobiene, fotoprotectoare față de radiația UV-A și UV-B, sunt susținute de  
27 studiile de acțiune specifică „*in vitro*”, realizate pe linii celulare standardizate: HaCaT (kerati-  
nocit uman normal), HS 27 (fibroblast dermic uman normal), HUVEC (endoteliu vascular).

29 În funcție de mecanismele implicate, îmbătrânirea pielii poate fi intrinsecă  
(cronologică) și extrinsecă (foto-îmbătrânirea). Îmbătrânirea cronologică este caracterizată  
31 prin: scăderea turn-over-ului celular al fibroblaștilor dermici și a sintezei proteinelor din  
matrixul extracelular, depleție de estrogeni, cu consecințe asupra ratei de proliferare celulară  
33 și a producerii colagenului, epiderm mai subțire, cu o rată proliferativă a keratinocitelor dimi-  
nuată față de normal. Foto-îmbătrânirea este caracterizată prin: creșterea numărului fibro-  
35 blaștilor hiperplastici, capacitate redusă de sinteză a colagenului, acumulări de fibre dense  
de elastină și colagen, cu structură dezorganizată, ca rezultat al cicatrizării deficitare în urma  
37 leziunilor produse de radiația UV, rată proliferativă a keratinocitelor mai mare decât cea  
normală, epiderm îngroșat, prezența inflamației.

39 Modificările semnificative suportate de piele în timpul menopauzei reprezintă manifes-  
tarea dereglărilor suferite de componentele individuale ale acesteia. Estrogenii reglează  
41 diverse funcții celulare, printre care proliferarea, morfogeneza, diferențierea și apoptoza.  
Căile de semnalizare prin care estrogenii influențează funcțiile celulare sunt complexe, impli-  
43 când receptori intracelulari (nucleari sau membranari) care intervin în reglarea transcrierii  
unor gene [Verdier-Sevrain S., Bonte F., Gilchrest B., **Experimental Dermatology 2006:**  
45 **15: 83-94**]. Metabolismul celular este influențat de starea de hipoestrogenism din timpul  
menopauzei, ce determină modificări în conținutul de colagen, alterări ale concentrației de  
47 glucozaminoglicani și, cel mai important, în conținutul de apă [Raine-Fenning N. J., Brincat  
M. P., Muscat-Baron Y., **Am J Clin Dermatolog 2003; 4(6): 371-8**]. Aceste modificări  
49 alterează funcțiile pielii, determinând îmbătrânirea acesteia, scăderea cantității de colagen,  
deci diminuarea elasticității și fermității, reducerea cantității de glucozaminoglicani hidrofili,  
51 deci scăderea conținutului de apă ce influențează hidratarea.

De asemenea, scăderea producției de sebum ce reprezintă un film protector efectiv, ce diminuează pierderile de apă la menopauză, este un factor ce contribuie la neplăcerile legate de pielea uscată și rugoasă. Acneea este o boală inflamatorie cronică a glandelor pilosebacee, caracterizată prin macule, papule, pustule și, uneori, noduli, chisturi și cicatrici. Pielea și, în mod special, unitatea pilosebacee poate fi considerată un organ endocrin, fiind atât ținta pentru diferiți hormoni, exprimând receptori specifici, cât și sediu al sintezei altora. S-a demonstrat implicarea hormonilor steroizi, retinoizi, a liganzilor receptorilor nuclear și a hormonilor de stres în controlul dezvoltării unităților pilosebacee, în lipogeneza glandelor sebacee [Wen-Chieh Chen and Christos C. Zouboulis, <i>Dermatoendocrinol.</i> 2009 Mar-Apr; 1(2): 81-86]. Supraproducția de hormoni androgeni și nivelul scăzut de estrogeni stau la baza declanșării acneei, a alopeciei androgenice și a seboreei. „Hiperandrogenismul cutanat” este cauzat de supraexpresia „ <i>in situ</i> ” a enzimelor androgene și a hiper-responsivității receptorilor androgeni [Christos C. Zouboulis, <i>Sebaceous gland receptor - Dermato-Endocrinology</i> 1:2, 81-86; March/April 2009].	1 3 5 7 9 11 13
În cadrul invenției, ca acțiuni pentru remodelarea țesutului cutanat îmbătrânit au fost urmărite efectele privind: acțiunea „estrogen-like”, creșterea turn-overului celular și a sintezei de collagen - pentru îmbătrânirea cronologică; îndepărtarea proteinelor degradate (activarea metaloproteinazelor - MMP), accelerarea sintezei proteice, reconstrucția microvasculaturii dermice afectate de radiația UV, efectele antiinflamator și foto-protector - pentru foto-îmbătrânire; efectul antioxidant, accelerarea metabolismului celular (sinteza de ATP) și regenerarea epidermală - pentru ambele tipuri de proces.	15 17 19 21
Conform prezentei invenții, obținerea culturilor de <i>Trigonella foenum graecum</i> se realizează în sistem ecologic și/sau alternativ, iar tehnologiile de extracție a componentelor/ingredientelor cosmetice presupun consumuri energetice minime și randamente optime, conform principiilor tehnologiilor "prietenoase cu mediul".	23 25
Culturile agricole ecologice reprezintă soluția pentru rezolvarea problemelor legate de satisfacerea cererii tot mai crescute pentru produsele naturale, ce nu presupun folosirea substanțelor chimice de sinteză. Lipsa pesticidelor remanente în planta utilizată ca sursă de materii prime este un deziderat al industriei farmaceutice și cosmetice, în special datorită utilizărilor terapeutice ale fitocompușilor.	27 29
Majoritatea ingredientelor cosmetice vegetale sunt utilizate conform tradiției, fără să fie susținute de studii științifice de eficiență și siguranță. Mult utilizate drept ingrediente cosmetice, sub formă de extracte din plante datorită proprietăților de detergenți, sunt saponinele triterpenice sau steroidice, care, datorită distribuției asimetrice: aglicon hidrofob și lanț zaharic hidrofil, prezintă caracter amfipatic ce determină proprietatea acestora de a forma spumă și a reduce tensiunea de suprafață. Beneficiile acestora pentru om se referă la utilizarea: în industria detergenților, industria farmaceutică, datorită posibilității de a forma complexe cu colesterolul, deci ca agenți hipolipemianți; agenți antiinflamatori; fiind precursori chimici ai hormonilor steroidici, ai cortizonului, vitaminei D, glicozizilor cardiotonici, drept materie primă în sinteza acestora. Saponinele steroidice însoțesc de multe ori glicozizii cardiotonici. Primele saponine steroidice cercetate au fost cele din diferite specii de <i>Digitalis</i> , dar ele se găsesc și în ovăz, ardei iute, vinete, semințe de tomate, ceapă, sparanghel, schinduf, yucca, ginseng, yam.	31 33 35 37 39 41 43
Interesul crescut pentru utilizarea unor compuși steroidici obținuți din diferite surse vegetale în diferite produse cosmetice este dovedit de existența brevetelor de invenție și a cererilor de brevet de invenție. Astfel:	45
Brevetul WO 00/30603 propune ca ingredient activ agliconul saponinei steroidice obținut din <i>Dioscorea tokoro-diosgenina</i> ca agent de subțiere, datorită acțiunii asupra adipocitelor, iar brevetul DE-19841795 propune utilizarea diosgeninei ca inhibitor de collagenază și agent antimicrobian, în tratarea diferitelor afecțiuni cu componentă infecțioasă, inclusiv	47 49

# RO 128905 B1

1 dermatita seboreică și acnee. De asemenea, s-a raportat și proprietatea acesteia de a inhiba  
activitatea enzimei 12-lipoxigenază [Nappez și colab. "Cancer Lett" vol. 4, 1995, pp. 133-  
3 140]. Hecogenina și tigogenina steroide obținute din *Agave americana* se pare că posedă  
activitate antiinflamatoare [Peana și colab. "Planta Med.", 63, 199-202 (1997)].

5 Îmbătrânirea cutanată poate fi tratată, conform brevetelor US 200220028186;  
US 6331535; FR 2811561; FR 2811567, cu diferite compoziții ce includ sapogeninne,  
7 inclusiv diosgenina. Saponinele steroidice din *Avena*, avenacozida A și B cu aglicon  
nuatigenina, posedă proprietăți amfotere cu abilitatea de a se cosolubiliza atât în faza  
9 apoasă, cât și în cea uleioasă. De asemenea, aceste saponine prezintă proprietăți  
antifungice.

11 Cererea de brevet de invenție US 20030235599 relatează despre o compoziție ce  
conține sapogenine, potrivită utilizării aplicațiilor topice pentru catifelarea și netezirea ridurilor  
13 și a liniilor fine.

Pentru a preveni semnele de îmbătrânire, în cererea de brevet de invenție  
15 US 2003152597 este propus un extract natural ce conține sapogenine, cu efecte asupra  
elasticității și tonicității pielii, formării ridurilor și liniilor fine, ce acționează prin inhibarea  
17 colagenazelor.

Cererea de brevet de invenție US 20030211185 propune utilizarea saponinelor  
19 spirostanolice din *Tribulus terrestris*, pentru tratarea infecțiilor bacteriene, fungice și virale,  
în particular, a celor din sfera genitală.

21 Un extract bogat în saponine spirostanolice obținut din *Tribulus terrestris*, conform  
US 6607765, este utilizat în terapeutică, pentru tratarea diferitelor infecții bacteriene, fungice,  
23 virale, în special din zona ginecologică.

În cererea de brevet US 20030152597 este revendicat un extract natural ce conține  
25 sapogenine, pentru prevenirea apariției semnelor îmbătrânirii pielii, în principal pierderea  
elasticității și/sau a tonicității, sau formarea ridurilor, prin efect de inhibare a colagenazelor.

27 Brevetul US 5505502 revendică utilizarea unui extract obținut din ienupăr, cu un efect  
de subțiere a secrețiilor grase, îmbunătățind simptomele legate de acnee, dar structura  
29 chimică implicată evidențiază prezența polizaharidelor acide, de tip pectinic.

US 6905714 revendică un preparat obținut din planta *Eucommia ulmoides*, utilizat în  
31 modularea metabolismului hormonilor steroizi androgeni - de exemplu, cei legați de dezvol-  
tarea sexuală primară, de procesele anabolice, de efectele asupra pielii, de creșterea părului,  
33 precum și de metabolismul lipidic.

EP 1900356 (A1) revendică utilizarea unui extract obținut din semințe de schinduf,  
35 caracterizat prin aceea că este vorba de un amestec de saponine și/sau sapogenine în con-  
centrație de cel puțin 8%, cu utilizări farmaceutice, alimentare sau ca suplimente. Preparatul  
37 obținut sub formă de capsule sau tablete conține 100...200 mg extract de schinduf/capsulă  
și este destinat stimulării sau revitalizării epidermei, a părului, unghiilor, prevenirii formării  
39 mătreții.

FR 2819409 revendică utilizarea diosgeninei obținută din *Dioscorea* prin sinteză,  
41 extracție, biotehnologie, inginerie genetică, singură sau în combinație cu alte plante, în  
dermatocosmetică, în special pentru tratarea celulei.

43 WO 2009088109 (A1) revendică o compoziție de albire a pielii, ce conține diosgenină  
obținută din oricare sursă de *Dioscorea* (japonica, tokoro, septemloba) și, alternativ, se poate  
45 folosi și diosgenina comercială, livrată de firma Sabinsa.

**US 20060074108 (A1)** propune o compoziție cosmetică și farmaceutică de inhibare a matricei metaloproteinazelor, în care, pentru îmbunătățirea circulației, se introduc diferite extracte de plante, printre care și schinduful, ce conține diosgenină. Nu se specifică o concentrație sau o compoziție chimică a extractului. 1  
3

O formulă cosmetică brevetată prin **DE 102005057292 (A1)**, destinată îngrijirii unghiilor, părului, pielii, conține un extract de schinduf cu un conținut în diosgenină de minimum 0,03 g/100 mL, iar în produsul final - de 0,00015...0,003%. Produsul poate avea și aplicații farmaceutice, și atunci conținutul în extract de schinduf crește la 1,75...2,25%. 5  
7

Utilizarea la scară industrială a saponinelor este limitată în primul rând de prețul de cost. Majoritatea procedeele de extracție a saponinelor steroidice folosesc drept materie primă plante ce se cultivă mai puțin în țara noastră, ca, de exemplu: *Tribulus terrestris*, diferite specii de *Dioscorea* și semințe de *Trigonella foenum graecum*. *Tribulus terrestris* este o plantă cultivată în SUA, Asia și Mexic. Se utilizează în medicina tradițională din aceste spații geografice, pentru efectele asupra creșterii și dezvoltării musculaturii, a potenței datorită stimulării nivelului testosteronului. *Dioscorea deltoidea* este cultivată în Asia și este utilizată tradițional pentru tratarea astmului și creșterea nivelului de testosteron. *Avena sativa*, ovăzul, reprezintă o altă sursă de materie primă ce conține saponine steroidice, în cantități totuși reduse pentru valorificarea industrială. Saponina steroidică identificată este avenacozida - de tip furostanolic. *Trigonella foenum graecum* - schinduful este o plantă cultivată în sudul Europei, în zona Mediteranei și în vestul Asiei. În România, zonele favorabile pentru cultivarea schindufului sunt cele din S-E țării (județele Brăila și Constanța). Este singura materie primă vegetală ce poate fi exploatată la nivel industrial pentru obținerea agliconilor steroidici, din zona noastră geografică. 9  
11  
13  
15  
17  
19  
21  
23

În **Monografia ESCOP ed. II - (p. 511)**, compoziția chimică a semințelor de schinduf evidențiază, ca și componente principale, saponinele steroidice, în principal furostanolice, care, prin hidroliză, eliberează agliconii steroidici spirostanolici, în cantitate de 0,6...1,7%, din care în principal diosgenina și epimerul lui yamogenina, în raport 3:2, împreună cu tigogenina și alți agliconi. Conținutul în substanțe lipidice al semințelor de schinduf este evaluat la o valoare cuprinsă în intervalul 5...10%. O valoare destul de ridicată, 25...45%, în compoziția semințelor de schinduf o reprezintă mucopolizaharidele, în principal galactomanani. Alți constituenți importanți sunt trigonellina - un alcaloid piridinic, și aminoacizi liberi 4-hidroxi-izoleucina. 25  
27  
29  
31

Conform monografiei, indicațiile terapeutice ale plantei se referă la utilizarea ca adjuvant în terapia diabetului, anorexie, hipercolesterolemie moderată, iar pentru uz extern, în tratarea furunculozei, a ulcerelor și eczemelor, ca emolient prin aplicarea cataplasmelor obținute prin fierberea semințelor în apă. Schinduful este o plantă valoroasă atât medicinală, cât și alimentară. În țările mediteraneene, în alimentație se folosesc frunzele, iar semințele se adaugă în diferite preparate de orez, ca și condiment în Iran, în brânzeturi în Elveția, în bitter în Germania, în Egipt în pâine, colorant alimentar și condiment în curry, înlocuitor de cafea în Africa, dar și ca insecticid și agent de parfumare. 33  
35  
37  
39

Se cunosc o serie de brevete de invenție ce vizează valorificarea componentelor bioactive din schinduf, dar acestea fie se referă numai la unul sau cel mult două clase de substanțe, și anume, ulei și oleozine ce includ și saponinele, fibrele solubile și/sau insolubile - mucopolizaharide de tipul galactomananilor, fie la utilizarea/includerea extractului de schinduf - caracterizat prin conținutul de 4-hidroxiizoleucina în diferite compoziții cosmetice. Astfel: 41  
43  
45

- brevetul **US 6013289 (A)** propune obținerea unei compoziții de parfumare din semințele de schinduf, prin operația de hidroliză la temperatură ridicată, pentru inactivarea enzimelor, separarea prin centrifugare a hidrolizatului, separarea în fază lichidă, evaporarea, concentrarea și uscarea produsului, utilizat în alimentație. Nu se specifică așadar conținutul sau analiza chimică a acestei compoziții de parfumare. 47  
49

# RO 128905 B1

1 O metodă de extracție a saponinelor steroidice din schinduf este brevetată în  
CN 1170599 (A), în care, după extracția cleiului, semințele sunt supuse extracției cu gazo-  
3 lină, și apoi hidrolizei, pentru obținerea unui produs medicinal ieftin în comparație cu cel obți-  
nut din *Dioscorea*. Nu se specifică nici compoziția chimică și nici randamentele obținute  
5 pentru produsul obținut.

7 **RU 2192271 (C1)** prezintă o metodă de obținere a unui agent cardiotropic sub forma  
unui preparat lichid din semințe de schinduf, prin extracție cu alcool etilic 95%, în raport 1:1,  
la temperatura de 18...20°C, timp de 144 h, în 6 difuzoare. Produsul nu este caracterizat  
9 chimic, nefiind specificată compoziția și randamentul de obținere a produsului.

11 **WO 0174371 (A1)** prezintă aplicațiile farmaceutice ale unui produs obținut din  
mucilagii de tip galactomanani din semințele de schinduf. Mucilagiile se prezintă sub forma  
unei făini cu un conținut în oze de 60%, dintre care 50...55% sunt galactomanani și maximum  
13 5% proteine.

15 **US 20100129296** revendică un procedeu de obținere a unui extract apos obținut din  
semințe de schinduf folosit ca dezinfectant, agent de conservare sau pentru tratarea herpe-  
sului, a acneei, a dermatitelor, răni infectate, periodontite. Procedeu implică etapa de umec-  
17 tare a semințelor în apă timp de 3...24 h, fierberea timp de 30 min și conservarea prin  
înghețare. Pentru purificare se aplică cromatografia cu faza inversă, și eluția cu un amestec  
19 de acetonitril/apă. Nu se prezintă compoziția chimică și randamentul de obținere.

21 **CN 1456570 (A)** prezintă o metodă de obținere a saponinelor din semințele de  
schinduf, ce presupune etapele de dez mucilaginare, dezlipidizare, pulverizare și extracția  
apoasă, la o temperatură cuprinsă în intervalul 40...80°C, timp de 20...40 h. Purificarea se  
23 realizează pe rășini macropore, obținându-se un randament de 0,8...15%. Procedeu  
presupune extracția doar a saponinelor, dezavantajul fiind că celelalte componente rămân  
25 în plantă, neextrase.

27 Procedeu de extracție a saponinelor și sapogeninelor conform **FR 1496965 (A)**  
presupune etapa de îmbibare a semințelor de schinduf în apă de robinet la 37°C, timp de 2  
zile, urmată de hidroliza în mediu de HCl 2N, la reflux, timp de 2 h, răcirea, filtrarea, neutrali-  
29 zarea cu soluție amoniac și uscarea precipitatului obținut în curent de aer cald. Dintr-un kg  
materie primă se obțin 400 g precipitat pulbere care se purifică prin macerare repetată în  
31 percolator, cu eter de petrol. Extractul obținut se concentrează și se obțin 2 fracții: 5 g  
pulbere denumită diosgenină brută, și 39 g fază uleioasă. Produsele obținute nu sunt  
33 caracterizate chimic.

35 **FR 2867686 (A1)** propune un procedeu de obținere a unui ulei din semințele de  
schinduf, cu utilizări cosmetice sau alimentare, ambalat în flacoane sau sub formă de  
capsule, pentru proprietățile antioxidante, ca agenți tensioactivi, pentru tratarea uscăciunii  
37 cutanate, scăderea colesterolului. Procedeu constă în extracția la rece sau la cald, cu hexan  
sau cu fluide supercritice, sub presiune, la cald la 20...60°C, sau la temperatură mai ridicată,  
39 60...80°C, când se obține o cantitate de 1...5 % ulei. Extracția cu CO<sub>2</sub> supercritic determină  
obținerea a 6...10% ulei. Compoziția uleiului evidențiază o valoare >64% de acizi grași poli-  
41 nesaturați, dintre care Omega 6 - 40,6% și Omega 3 - 25,3%, steroli >1%, tocoferoli >0,5%.  
Procedeu se referă la obținerea doar a uleiului purificat din semințe de schinduf, nu se fac  
43 referiri legate de celelalte componente active din materia primă.

45 Pentru îmbunătățirea metabolismului glucidic, în tratarea problemelor legate de  
diabet, brevetul **WO 2009136219 (A1)** propune o compoziție pe bază de galactomanani, obți-  
nută din semințele de schinduf. Procedeu constă în extracția timp de 3...12 h cu un solvent  
47 hidrocarbonat alifatic și un hidroalcool, la temperatura 30...40°C, concentrarea soluției obți-  
nute, purificarea pe rășini schimbătoare de ioni, pentru îndepărtarea bazelor azotate și

# RO 128905 B1

ionice, trecerea pe o coloană adsorbantă ce reține substanța activă, pentru purificare, concentrare și uscare sub vid, obținându-se produsul galactomanan de puritate 90...97, caracterizat prin  $M = 200...1000$  Daltoni, și formula  $C_{24}H_{48}O_{32}$ , în cantitate de 32 g din 100 g semințe schinduf. Procedul implică utilizarea solvenților: hexan, heptan, octan, ciclohexan și a soluțiilor hidroalcoolice 1:9...9:1. Procedul este laborios și utilizează solvenți ușor inflamabili.

**JP 2005060366 (A)** propune un stimulator al procesului de lipoliză, ce conține drept ingredient activ o plantă sau un extract dintr-o plantă, cum ar fi: ienupăr, rădăcini de polygala, pătlagină, muștar alb, iederă, trandafir japonez, schinduf. Extractul se poate obține prin oricare din metodele extracției: simplă sau Soxhlet, la temperatură obișnuită sau la fierbere, cu amestecuri hidroalcoolice sau diferiți solvenți propilenglicol, butilenglicol, cetone, acetat de etil; condițiile de extracție diferă în funcție de solvent. Astfel, din semințe de schinduf se obține un extract hidroalcoolic, caracterizat prin reziduul la evaporare de 1,4 g/100 mL.

**WO 2005009453 (A1)** propune obținerea unei pudre din semințele de schinduf, din care s-a îndepărtat fracția amară și cea lipidică, utilizat ca supliment nutritiv datorită conținutului în fibre solubile, vitamine, aminoacizi, în principal 4-hidroxiizoleucină.

**KR 20040059006 (A)** propune o compoziție cosmetică de albire, ce conține un extract de schinduf obținut prin extracția cu unul dintre solvenții: apă, alcool inferior, acetat de etil, acetonă. Extractul obținut nu este caracterizat, nefiind prezentată compoziția chimică.

Procese de extracție a semințelor de schinduf sunt prezentate în brevetele: **US 5658571**, **US 5997877**, **US 6013289**, **US 6013304**, **US 6495175**, dar în niciunul dintre aceste brevete nu se valorifică integral componentele bioactive ale semințelor de schinduf. Astfel:

- **US 5658571** prezintă un proces static, utilizând un singur solvent, obținându-se un amestec al fracțiunilor, deci nu se revendică separarea fracțiunilor individuale prin extracția secvențială, succesivă, utilizând solvenți de polarități diferite. De asemenea, este prevăzută încălzirea extractului după ce semințele au fost imersate în solvent. Alături de alcoolul izopropilic sau etilic se pot folosi și alți solvenți organici, cum ar fi cei clorurați toxici, neadecvați utilizării în scopuri alimentare;

- **US 5997877** propune un procedeu dinamic de obținere a diferitelor fracții valoroase comercial din schinduf. Conform acestuia, din semințele de schinduf se pot obține următoarele preparate: fibre alimentare solubile, în cantitate de 30...48 g/100 g semințe cu o concentrație de 89...96% și un preparat de oleorezine în cantitate de 11,75 g/100 g semințe, ce includ și saponinele steroidice (dioscina). Caracterizarea chimică a preparatului de oleorezine se face doar prin conținutul de saponine exprimate în agliconul corespunzător, diosgenină de 1,4%. Pentru extracția oleorezinelor se folosește alcoolul etilic 95%, iar materia primă virgină sau deja extrasă, desparfumată, se poate folosi la obținerea fibrelor solubile prin extracția cu apa. Utilizarea comercială a oleorezinelor se referă la folosirea acestora ca ingredient de imitare/inlocuire a aromei de arțar, în alimentație. Procedul prezintă o serie de dezavantaje prin aceea că produce oleorezine fără a extrage uleiul, de aceea acestea s-ar putea să fie în amestec cu uleiul, determinând astfel un gust amar și posibilitatea de a râncezi. De asemenea, pentru a crește umiditatea semințelor, se folosește apa înainte de a realiza extracția cu alcool etilic și a îndepărta uleiul. Metoda aplicată este total diferită de cea propusă în brevetul de invenție menționat de noi;

- **US 6495175** revendică obținerea componentelor din semințele de schinduf în etape: astfel, în prima extracție, realizată la cald, utilizând eter de petrol, hexan, n-propanol, izopropanol sau combinații ale acestora, se obține un extract din care, prin prelucrare-distilare, se obține uleiul, iar prin extracția la cald cu al doilea solvent, care poate fi etanol, izopropanol,

# RO 128905 B1

1 izopropanol apos, etanol apos și combinații ale acestora, rezultă un amestec de oleorezine  
și ulei. Pentru separarea oleorezinelor de ulei masă obținută prin distilarea solventului de  
3 extracție, se suspendă în alcool etilic 95% timp de 45...90 min la temperatura 45...55°C,  
urmată de răcire la - 10...- 15°C. Materia vegetală solidă, rămas după cea de-a doua extrac-  
5 ție, reprezintă fibrele alimentare desparfumate și delipidizate, de culoare galben-cafeniu  
deschis. Se revendică și un sistem/instalație de extracție, alcătuit dintr-un condensator, un  
7 vas de extracție, redistilator, rezervor de extract, buclă reintroducere a solventului în sistem.  
Oleorezinele, uleiul și fibrele alimentare obținute nu sunt caracterizate, standardizate, printr-o  
9 compoziție chimică și un randament de extracție.

Din datele prezentate cu privire la stadiul tehnicii în domeniul obținerii unor substanțe  
11 sau produse bioactive cu utilizări cosmetice, din planta *Trigonella foenum graecum* - semințe  
de schinduf, rezultă următoarele dezavantaje:

13 - materia primă vegetală este utilizată neeconomic, urmărindu-se obținerea în mod  
obișnuit a unei clase sau a amestecului a două clase de substanțe, cum ar fi: ulei și oleore-  
15 zine - **FR 2867686 (A1)**; oleorezine și saponinele steroidice - **FR 1496965 (A)**, **EP 1900356**  
(A1), ulei și fibrele solubile și/sau insolubile - mucopolizaharide de tipul galactomananilor -  
17 **WO 0174371 (A1)**, **WO 2009136219 (A1)**, sau utilizarea extractului de schinduf - caracterizat  
prin conținutul de 4-hidroxiizoleucină - **WO 2005009453 (A1)**, în diosgenina aflată în cantitate  
19 foarte mică - **DE 102005057292 (A1)** sau a amestecurilor fracțiunilor - **US 5658571**, ceilalți  
compuși rămânând în plantă, aceasta considerându-se deșeu; în niciunul dintre aceste  
21 brevete nu se valorifică integral componentele bioactive ale semințelor de schinduf;

- utilizarea solvenților inflamabili, ce nu sunt de calitate farmaceutică: eter de petrol,  
23 hexan, n-propanol, izopropanol: **US 6495175**, **FR 2867686 (A1)**;

- extracția uleiului și oleorezinelor are loc cu consumuri energetice mari, la cald,  
25 **US 6495175**, sau în instalații costisitoare cu fluide supercritice sau neadequate valorificării  
industriale - Soxhlet **FR 2867686 (A1)**;

27 - produsele obținute în brevetele prezentate nu sunt standardizate în componentele  
active, sau nu sunt prezentate date legate de compoziția chimică sau randamentele de  
29 obținere - **KR 20040059006 (A)**, **FR 1496965 (A)**;

- nu s-au realizat produse cosmetice cu componente izolate din această plantă, cu  
31 activitate estrogen mimetică evidențiată prin studii la nivel celular;

- brevetele de invenție referitoare la utilizarea plantei *Trigonella foenum graecum*  
33 prezintă procedee de obținere a unor compoziții farmaceutice, nutriceutice sau alimentare,  
în principal pentru uz oral; utilizarea topică cosmetică se reduce la acțiunea dezinfectantă,  
35 antiinflamatoare, de albire, de îngrijire a părului și pielii, revitalizare, tratarea uscăciunii pielii,  
antioxidantă.

37 Majoritatea brevetelor de invenție referitoare la activitatea biologică a plantei  
*Trigonella foenum graecum* prezintă utilizarea diferitelor componente izolate pentru:

39 - uz intern în alimentație sau ca suplimente nutritive - **US 6013289 (A)**;

- ca agent/compoziție de parfumare în alimentație; agent cardiotropic sub forma unui  
41 preparat lichid din semințe de schinduf - **RU 2192271 (C1)**;

- produs farmaceutic pe bază de galactomanani, utilizat în tratarea problemelor legate  
43 de diabet, pentru abilitatea acestora de a reține apa și a scăderii absorbției intestinale a  
glucozei - **WO 2009136219 (A1)**, **WO 0174371 (A1)**;

45 - extract apos din semințele de schinduf, ca agent de conservare, dezinfectant sau  
pentru tratarea herpesului, a dermatitelor, acneei, răni infectate, periodontite -  
47 **US 20100129296**;



# RO 128905 B1

- supliment nutritiv sub formă de pudră, utilizat datorită conținutului în fibre solubile, vitamine și aminoacizi, mai ales 4-hidroxiizoleucină - WO 2005009453 (A1);	1
- extract cu utilizări farmaceutice, alimentare sau ca suplimente, pentru revitalizarea părului, unghiilor, părului, de uz oral, sub formă de capsule sau tablete, cu un conținut de saponine sau sapogenine de 0,1...0,2 g extract/capsulă - EP 1900356 (A1);	3 5
- stimularea procesului de lipoliză în produse cosmetice, utilizând un extract hidroalcoolic dintr-o plantă cum ar fi: schinduf, ienupăr, rădăcini de polygala, pătlagină, muștar alb, iederă, trandafir japonez - JP 2005060366 (A);	7
- ulei pentru utilizări cosmetice și/sau alimentare, sub formă de capsule sau în flacoane, pentru proprietățile antioxidante, ca agenți tensioactivi, tratarea uscăciunii cutanate sau scăderea nivelului colesterolului - FR 2867686 (A1);	9 11
- pentru albirea pielii, o compoziție cosmetică ce conține un extract de schinduf - KR 0040059006 (A), DE 102005057292 (A1).	13
Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție este de valorificare ecologică a resurselor de plante medicinale, aplicabilă la scară industrială, prin care se utilizează integral componentele biologic active ale plantei <i>Trigonella foenum graecum semen</i> , ce presupune extracția selectivă în trepte și separarea componentelor farmaceutic și cosmetic active, reciclarea materiilor vegetale și a resurselor utilizate.	15 17
Soluția prin care se rezolvă problema tehnică, în conformitate cu invenția de față, constă în:	19
- procedeul de obținere a unei game largi de extracte: ulei, extract steroidic glicozidat, extract steroidic neglicozidat, extract polizaharidic de tipul galactomananilor din <i>Trigonella foenum graecum semen</i> și reciclarea materiilor prime;	21 23
- obținerea de produse cosmetice - prin asocierea în diferite combinații și proporții a extractelor - destinate prevenirii și tratării fenomenelor de îmbătrânire cutanată, precum și în terapia formațiunilor acneice.	25
Conform invenției, procedeul de obținere a extractelor din <i>Trigonella foenum graecum semen</i> se realizează în mod diferit față de procedeele menționate, și cuprinde următoarea succesiune de etape:	27 29
a) semințele de schinduf, uscate și măcinate, se introduc în instalația de extracție rapidă, ce are montată o buclă de recirculare, formată din două pompe centrifuge, și se supun extracției dinamice în același flux, succesiv în patru trepte, primul solvent utilizat fiind acetona în raport de 1:5...1:10, timp de 2 h/treaptă, la temperatura de 18...25°C, soluțiile obținute se supun operațiilor de concentrare, pentru recuperarea solventului și obținerea extractului brut uleios, care se supune purificării prin filtrare și distilare înaintată sub vid, pentru eliminarea urmelor de solvent de extracție, rezultând uleiul purificat de schinduf, denumit extract lipofil obținut în cantitate de 30...70 g/kg plantă, cu un conținut în acizi grași esențiali mono- și polinesaturați $\omega$ -3 și $\omega$ -6 de minimum 80%;	31 33 35 37
b) extracția masei vegetale rămasă din etapa a) în vasul de extracție cu alcool etilic 80...96%, de calitate farmaceutică, în trei trepte, timp de 2 h/treaptă, la temperatura de 18...25°C, soluțiile extractive obținute se supun concentrării sub vid, recuperării solventului și reintroducerii acestuia în proces, și apoi condiționării în propilenglicol, glicerină sau butilenglicol, cu obținerea extractului steroidic glicozidat fluid, sub forma unui lichid brun roșcat limpede, cu miros caracteristic, standardizat în saponine steroidice totale de minimum 1%, și compuși flavonoidici de minimum 0,15 g/100 g, obținut în raport 1:1...3:1 materie primă vegetală: extract; sau soluțiile extractive obținute se usucă prin concentrare sub vid, iar produsul obținut se suspendă în acetonă, pentru separarea compușilor steroidici glicozidați de oleorezine, obținându-se extractul steroidic glicozidat uscat, sub formă de pulbere portocalie, cu un conținut în saponine steroidice totale de minimum 8%, și compuși flavonoidici de minimum 1,0 g/100 g, obținut în cantitate de minimum 80 g/1 kg semințe schinduf;	39 41 43 45 47 49

# RO 128905 B1

1 c) extracția masei vegetale rămasă în vasul de extracție după etapa b), cu soluții  
hidroetanolică de calitate farmaceutică, având o concentrație de 40...70%, în trei trepte, timp  
3 de 1...2 h/treaptă, la temperatura de 18...25°C, soluțiile extractive obținute se supun concen-  
trării sub vid, recuperării solventului și reintroducerii acestuia în proces; extractul concentrat  
5 apos obținut ce se găsește în instalația de concentrare se supune apoi operației de hidroliză  
acidă sub vid, timp de 1 h; extractul lichid obținut se neutralizează și se condiționează în  
7 glicerină, propilenglicol sau butilenglicol, fiind standardizat în agliconi steroidici totali  
0,2...0,3%, din care diosgenină 0,1...0,15%, și în compuși polifenolici exprimați în acid cafeic  
9 de 0,15...0,2%, obținut în raport 1:1...3:1 semințe schinduf:extract, denumit extract steroidic  
11 neglicozidat fluid, sau extractul lichid neutralizat se filtrează, pulberea obținută se usucă,  
obținând preparatul brut sub formă de pulbere brun-cafenie, cu un conținut în aglicon  
steroidic total de 8...10%, obținut în cantitate de minimum 20 g/1 kg semințe schinduf, din  
13 care prin operații succesive de purificare se obține produsul purificat cu un conținut în  
diosgenină de 60...90%, denumit extract steroidic neglicozidat uscat;

15 d) extracția materiei prime rămase în vasul de extracție după etapa c), cu apa purifi-  
cată încălzită la 30...60°C, în trei trepte, timp de 1 h/treaptă; soluțiile extractive obținute se  
17 răcesc, se filtrează și se concentrează sub vid, apoi se supun operației de precipitare în  
raport 1:2...1:4 cu alcool etilic 80...90%, de calitate farmaceutică; precipitatul alb obținut se  
19 separă prin filtrare sub vid, și se usucă în curent de aer cald la 50...60°C, obținându-se  
extractul polizaharidic sub forma unei pulberi gri-cafenii, cu un conținut standardizat în fibre  
21 solubile în apă de minimum 85%, obținut în cantitate de minimum 200 g/1 kg semințe  
schinduf;

23 e) reciclarea materialului vegetal epuizat sub formă de compost, prin încorporare în  
sol.

25 Extractele din semințele de schinduf obținute conform invenției sunt:

27 - extract lipofil, sub forma unui lichid galben, ușor opalescent, cu un conținut standar-  
dizat în acizi grași mono- și polinesaturați  $\omega$ -3 și  $\omega$ -6, obținut în cantitate de 3...5 g/100 g  
*Trigonella foenum graecum semen*;

29 - extract steroidic glicozidat fluid, condiționat în glicerină, propilenglicol sau butilen-  
glicol, sub forma unui lichid brun roșcat limpede, cu miros caracteristic, standardizat în saponi-  
31 nine steroidice totale de minimum 1% și compuși flavonoidici de minimum 0,15 g/100 g, obți-  
nut în raport 1:1...3:1 *Trigonella foenum graecum semen:extract*; sau extract steroidic  
33 glicozidat uscat, sub formă de pulbere portocalie, cu un conținut în saponine steroidice totale  
de minimum 8%, și compuși flavonoidici de minimum 1,0 g/100 g, obținut în cantitate de mini-  
35 mum 8 g/100 g *Trigonella foenum graecum semen*;

37 - extract steroidic neglicozidat fluid, condiționat în glicerină, propilenglicol sau butilen-  
glicol standardizat în agliconi steroidici totali 0,2...0,3%, din care diosgenină 0,1...0,15%, și  
în compuși polifenolici exprimați în acid cafeic de 0,15...0,2%, obținut în raport 1:1...3:1  
39 *Trigonella foenum graecum semen:extract*; sau extract steroidic neglicozidat uscat, sub  
formă de pulbere cafenie, cu un conținut în diosgenină cuprins în intervalul 60...90%;

41 - extract polizaharidic cu structură de galactomanani, sub forma unei pulberi gri-  
cafenii, cu un conținut standardizat în fibre solubile în apă de minimum 85%, obținut în can-  
43 titate de minimum 20 g/100 g *Trigonella foenum graecum semen*.

45 Produsele cosmetice obținute conform invenției, ce conțin ca substanțe biologice  
active extractele obținute din *Trigonella foenum graecum semen*, sunt:

47 - produse dermatocosmetice de tip antiîmbătrânire, în care extractele obținute din  
*Trigonella foenum graecum semen* se regăsesc individual sau asociate în diferite combinații  
și proporții, și anume: 0,5...3% extract lipofil și/sau 0,01...5% extract steroidic glicozidat  
49 și/sau 0,01...1% extract steroidic neglicozidat și/sau 1...15% extract polizaharidic, alături de

# RO 128905 B1

alte ingrediente cosmetice, condiționate sub formă de cremă, mască și loțiune, cu acțiune „estrogen-mimetică” de tip „retard”, de stimulare a ratei de proliferare celulară și sintezei de colagen, cu efect fotoprotector față de UV-A și UV-B și antiangiogenic, cu activitate antiinflamatoare, antiirritativă și antioxidantă, restabilind fermitatea și hidratarea țesutului dermo-epidermic;	1
- produse dermatocosmetice de tip antiacneic, în care extractele obținute din <i>Trigonella foenum graecum semen</i> se regăsesc individual sau asociate în diferite combinații și proporții, și anume: 0,01...5% extract steroidic glicozidat și/sau 0,01...1% extract steroidic neglicozidat și/sau 1...15% extract polizaharidic, alături de alte ingrediente cosmetice, condiționate sub formă de cremă, mască și loțiune, cu acțiune rapidă de modulare fito-hormonală, în condiții de dezechilibru estrogenic, antimicrobiană, antiirritativă și antioxidantă, antiinflamatoare la nivelul micro-vasculaturii și foto-protectoare.	3
Avantajele invenției în raport cu stadiul tehnicii sunt următoarele:	5
- prezintă un procedeu tehnologic aplicabil la nivel industrial, de valorificare integrală a resurselor plantei <i>Trigonella foenum graecum</i> , ce presupune obținerea a 4 tipuri de extracte reprezentând intermediari activi pentru preparate cosmetice;	7
- extracția selectivă, ce utilizează un sistem de extracție în trepte cu solvenți nepolari până la polari, epuizează materia primă de componentele valoroase;	9
- procedeul de extracție și separare, prin parametri tehnologici aplicați, determină, conform principiilor tehnologiilor ecologice, obținerea unor randamente optime, cu valorificarea tuturor resurselor și reciclarea pe cât posibil a acestora;	11
- instalația de extracție este simplă, dar foarte eficientă, fiind alcătuită din vase de extracție și rezervor din inox pentru solvent și soluțiile extractive, între care s-a montat o buclă de recirculare a solventului/miscelei, în care sunt amplasate 2 pompe centrifuge, a căror viteză aplicată imprimă o capacitate mare de extracție a componentelor din plantă;	13
- fiind o tehnologie ecologică, evită temperaturile de prelucrare mari, ceea ce presupune consumuri energetice reduse;	15
- timpul de extracție este mult redus datorită vitezei mari de recirculare a solventului/miscelei;	17
- etapele de concentrare se realizează sub vid, măbind astfel capacitatea de distilare și reducând timpul operațiilor;	19
- comparativ cu produsele realizate din <i>Trigonella foenum graecum</i> , conform brevetelor menționate la stadiul tehnicii la care s-au evidențiat acțiunile: dezinfectantă, antiinflamatoare, de albire, de îngrijire a părului și pielii, revitalizare, tratarea uscăciunii pielii, antioxidantă, la extractele obținute conform invenției, s-au demonstrat prin studii <i>in vitro</i> la nivel celular: activitatea estrogen mimetică, antiinflamatoare la nivel micro-vascular, antimicrobiană, fotoprotectoare față de radiația UV-A și UV-B, acestea fiind susținute de studiile de acțiune specifică, realizate pe linii celulare standardizate: HaCaT (keratinocit uman normal), HS 27 (fibroblast dermic uman normal), HUVEC (endotelium vascular).	21
Utilizarea extractelor obținute din <i>Trigonella foenum graecum semen</i> , conform invenției, este susținută și de eficacitatea produselor cosmetice realizate, evidențiată în studiile clinice pe voluntari umani.	23
S-au efectuat teste în vederea evidențierii activității specifice și evaluării aplicațiilor în terapeutică a extractelor obținute prin valorificarea integrală a plantei <i>Trigonella foenum graecum</i> .	25
<i>Demonstrarea activității estrogen mimetice</i>	27
Fibroblaștii și keratinocitele exprimă receptori pentru estrogeni, procesele de tipul proliferării, morfogenezei, diferențierii sau apoptozei, fiind strict reglate de cuplarea acestor receptori la liganzi (moleculă semnal, principii bioactive) [Verdier-Sevrain S., Bonte F.,	29

1 **Gilchrest B., Experimental Dermatology 2006: 15: 83-94**. Pentru a testa efectul estrogen  
 3 mimetic al extractelor steroidice neglicozidate, s-a realizat simularea *in vitro* a condițiilor de  
 depleție hormonală, utilizându-se două serii de testare paralele, una cu celule cultivate cu

5 Keratinocitele din linia celulară HaCaT, după 24 h de aderare, s-au tratat cu sub-  
 stanțele de interes timp de 48 h. S-a utilizat, de asemenea, și linia celulară standardizată HS  
 7 27 de fibroblaști dermici umani normali. Acțiunea substanțelor s-a evaluat după 48 h de incu-  
 bare. S-a analizat statusul proliferativ celular pentru extractele steroidice neglicozidate, prin  
 9 tehnici complementare de analiză: secvențialitatea ciclului celular și succesiunea generațiilor  
 proliferative, corelate, în cazul extractului steroidic neglicozidat uscat, și cu determinarea  
 11 influenței asupra sintezei de colagen și a activității metaloproteinazelor.

Rezultatele s-au estimat ca indice de proliferare, respectiv, suma procentelor de  
 13 celule în fazele de multiplicare S și G2/M calculate cu un soft de analiză specific. Tabelele  
 de mai jos prezintă acțiunea extractelor steroidice neglicozidate asupra liniilor celulare  
 15 standardizate de fibroblaști umani normali (HS 27) (tabelul 1) și keratinocite imortalizate  
 (HaCaT) (tabelul 2), comparativ cu martorul pozitiv (beta estradiolul 1 nM).

Tabelul 1

*Efectul extractelor steroidice neglicozidate asupra liniei celulare HS 27*

	Mediu cu conținut estrogenic normal				Mediu cu deficit estrogenic			
	%S+ %G2/M	% variație (%S+G2/ M)	I.P.	% variație IP	%S+ %G2/ M	% variație (%S+G 2/M)	I.P.	% variație IP
Martor celular	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
P5 1 nM	29,9	11,86	4,11	25,69	42,3	76,25	2,83	- 0,70
P5 5 nM	32,11	20,13	4,39	44,41	43,7	82,08	2,89	1,40
P5 10 nM	30,7	14,85	3,05	0,33	55	129,17	4,62	62,11
P4 1/8000	30,79	19,06	5,17	58,10	49,8	39,11	3,86	35,44
P4 1/16000	29,71	14,89	3,01	- 7,95	28,86	- 19,39	4,47	56,84
P4 1/32000	27,83	7,62	3,18	- 2,75	28,03	- 21,70	2,19	- 23,16
β-estradiol 1 nM	32,11	20,13	3,24	- 0,92	35,61	48,38	3,91	38,65

P4 = extract steroidic neglicozidat fluid; P5 = extract steroidic neglicozidat uscat

*Efectul extractelor steroidice neglicozidate asupra liniei celulare HaCaT*

	Mediu cu conținut normal de estrogeni				Mediu fără estrogeni			
	I.P.	% variație IP	% celule (S+ G2/M)	% variație (%S+ G2/M)	I. P.	% variație IP	% celule (S+ G2/M)	% variație (%S+ G2/M)
Martor	3,1		47,42		2,51		42,28	
PG	2,96		48,75		2,21		41,41	
P5 5 nM	3,05	3,04	45,12	- 7,44	3,53	59,58	43,70	5,52
P5 10 nM	3,12	5,29	48,76	0,02	3,24	46,61	50,71	22,44
P5 20 nM	2,85	- 3,82	46,94	- 3,71	2,87	29,71	46,70	12,76
P5 40 nM	4,17	40,72	52,80	8,31	3,26	47,36	48,44	16,96
P5 1/64000	2,99	0,90	44,41	- 8,90	3,02	36,80	47,77	15,35
P4 1/32000	2,76	- 6,97	46,62	- 4,36	3,07	38,91	41,75	0,82
P4 1/16000	2,75	- 7,31	49,62	1,79	3,03	37,10	42,65	2,99
P4 3/8000	3,37	13,84	53,76	10,28	3,84	73,60	42,62	2,91
β-estradiol 1 nM	3,07	- 1,08	44,94	- 5,24	3,41	36,17	47,60	12,59

P4 = extract steroidic neglicozidat fluid; P5 = extract steroidic neglicozidat uscat

*Efectul extractului steroidic neglicozidat uscat asupra statusului colagenului din matricea extracelulară a HS27*

	Mediu cu nivel normal de estrogeni						Mediu fără estrogeni					
	Colagen μg HgOH-Pro/2*10 <sup>5</sup> celule/ml		MMP9 (pixeli)		MMP2 (pixeli)		Colagen μg OH-Pro/2*10 <sup>5</sup> celule/ml		MMP9 (pixeli)		MMP2 (pixeli)	
		% variație		% variație		% variație		% variație		% variație		% variație
Martor celular	3,007		4,26		16,12		2,771		12,07		43,33	
Martor solvent	1,750		3,92		14,66		1,506		1,32		41,63	
P5 1 nM	4,724	62,96	4,97	20,52	23,85	38,5	3,585	58	7,12	- 59	35,95	-15,97
P5 5 nM	4,879	64,13	6,49	39,6	28,86	49,2	4,867	69,06	6,02	- 88,04	37,23	-11,82

P5 = extract steroidic neglicozidat uscat

# RO 128905 B1

1 Extractul steroidic neglicozidat uscat, în doză de 10 nM, și steroidic neglicozidat fluid,  
 2 în doză de 1/8000, stimulează rata de proliferare celulară în condiții de depleție estrogenică  
 3 la nivel de keratinocit, similar cu estrogenul sintetic,  $\beta$ -estradiolul. La nivel de fibroblast,  
 4 efectul estrogen-mimetic se menține atât pentru extractul steroidic neglicozidat uscat (5 nM  
 5 și 10 nM), cât și pentru extractul steroidic neglicozidat fluid (diluțiile 1/8000 și 1/16000), cele  
 6 două principii active demonstrând o acțiune concentrată la nivelul receptorilor de estrogeni  
 7 din piele, similară cu produșii de sinteză (beta estradiolul). De asemenea, extractul steroidic  
 8 neglicozidat uscat induce asupra celulelor crescute în condiții normale (cu estrogeni), într-o  
 9 manieră dependentă de doza aplicată, atât biosinteza colagenului, cât și activarea enzimelor  
 10 proteolitice MMP9 și MMP2, ajutând astfel la remodelarea matriceală corectă a zonei  
 11 afectată de radiațiile UV, prin înlocuirea fibrelor de colagen degradat, fără a se produce o  
 12 acumulare a acestuia. În situația în care celulele au fost private de estrogeni, extractul  
 13 steroidic neglicozidat uscat reechilibrează homeostazia colagenului în condiții de depleție  
 14 de estrogeni atât prin scăderea drastică a MMP9, cât și prin menținerea ratei crescute de  
 15 biosinteză a colagenului.

16 *Demonstrarea acțiunii de restaurare a fermității structurilor dermo-epidermice prin*  
 17 *inducerea supraexpresiei integrinelor  $\alpha1\beta1$  și  $\alpha2\beta1$*

18 Integrinele sunt proteine funcționale, alcătuite din 2 subunități glicoproteice ( $\alpha$  și  $\beta$ ),  
 19 care se extind de-a lungul membranei capabile să lege multipli liganzi, printre care și  
 20 molecule din matrixul extracelular, având un rol important în adeziunea celulară, mișcarea  
 21 și migrarea celulară. Integrina  $\alpha1\beta1$  mediază feed-back-ul de reglare a sintezei de colagen,  
 22 realizând legături de tip celulă-colagen sau celulă-laminină 1 din matrixul extracelular, iar  
 23 Integrina  $\alpha2\beta1$  mediază stimularea colagenazei de tip I (MMP1), cu rol în fibrilogenază  
 24 (organizarea colagenului în fibrile), leagă colagenul de tip I. Balanța între Integrina  $\alpha1\beta1$  și  
 25 Integrina  $\alpha2\beta1$  este importantă pentru menținerea echilibrului între degradarea și sinteza de  
 26 colagen [Riikonen T., Westermarck J., Broberg A., Kahari V. M., Heino J. (1995), J. Biol.  
 27 Chem., 270: 13548-13552; Zhang Z., Bothe I., Hirche F., Zweers M. C., Gullberg D.,  
 28 Pfitzer G., et al. (2006). J. Cell. Sci. 119: 1886-1895; Fujimura T., Moriwaki S., Imokawa  
 29 G., Takema Y., J. Dermatol. Sci. 2007 Jan; 45(1): 45-53, Epub 2006 Nov 21]. Tehnica de  
 30 evidențiere a integrinelor prin citometrie în flux presupune utilizarea anticorpilor monoclonali  
 31 pentru lanțurile  $\alpha$  și  $\beta$ .

32 Rezultatele (media a 3 teste) sunt prezentate în tabelul de mai jos, sub forma  
 33 medianei canalelor de fluorescență corespunzătoare expresiei celor 3 lanțuri glico-proteice:

	FITC-A Mean (CD 49b- Integrina alfa2)	% variație	PE-A Mean (CD 49a- Integrina alfa1)	% variație	APC-A Mean (CD 29- Integrina beta1)	% variație
35 Martor	14227,67		5310,67		4077,33	
37 PG	14526,33		5490,00		4170,33	
39 TGF beta 4 ng/ml	46264,00	225,17	7150,33	12,93	8225,00	97,23
41 P6 5 $\mu$ g/ml	12005,00	-15,62	3550,33	- 12,37	3475,33	- 16,67
43 P6 10 $\mu$ g/ml	14077,00	-1,06	4245,33	- 7,49	3761,00	- 9,82
P6 16,6 $\mu$ g/ml	14848,00	4,36	3754,67	- 10,94	4593,00	10,14
45 P6 33 $\mu$ g/ml	11780,33	-17,20	4517,00	- 5,58	3996,33	- 4,17

Tabel (continuare)

	FITC-A Mean (CD 49b- Integrina alfa2)	% variație	PE-A Mean (CD 49a- Integrina alfa1)	% variație	APC-A Mean (CD 29- Integrina beta1)	% variație
P6 50 µg/ml	19722,00	38,62	4925,67	- 2,71	3322,33	- 20,33
P6 75 µg/ml	19958,67	40,28	5917,67	4,27	5695,33	36,57
P6 100 µg/ml	31404,33	120,73	5846,67	3,77	5409,67	29,72
P6 150 µg/ml	32949,00	131,58	7759,33	17,21	6111,67	46,55
P5 5 nM	20652,00	45,15	4433,33	- 6,17	5025,33	20,50
P5 10 nM	29194,33	105,19	5601,33	2,04	5922,33	42,01
P4 1/8000	30595,33	115,04	7330,33	14,20	5411,67	29,77
P4 1/16000	27861,67	95,83	5983,33	4,73	5887,67	41,18
P2 1/50000	53028,67	272,72	10082,33	33,54	4442,33	6,52
P2 1/60000	60555,67	325,62	10973,67	39,80	4391,00	5,29

P2 = extract steroidic glicozidat fluid; P4 = extract steroidic neglicozidat fluid; P5 = extract steroidic neglicozidat uscat; P6 = extract polizaharidic

Extractul polizaharidic (50 µg/ml ÷ 150 µg/ml) induce în maniera doză efect expresia lanțului glicoproteic  $\alpha 2$ , la concentrațiile superioare având un efect generalizat în supraexpresia integrinei  $\alpha 1\beta 1$  și  $\alpha 2\beta 1$ . Extractul steroidic neglicozidat fluid, induce preponderent expresia lanțului glicoproteic  $\alpha 2$ , iar extractul steroidic glicozidat fluid, este cel mai activ dintre compușii analizați în supraexpresia lanțurilor  $\alpha 1$  și  $\alpha 2$ , cu efect superior chiar și marto- rului pozitiv (TGF beta 4 ng/ml).

Astfel, se recomandă utilizarea acestor extracte ca ingrediente active în restabilirea fermității țesutului cutanat, prin consolidarea legăturilor celulă dermică - matrix extracelular.

#### *Demonstrarea activității fotoprotectoare față de radiația UV-A și UV-B*

În pielea iradiată sunt generate specii de oxigen reactive, care produc degradări oxidative la nivelul lipidelor, proteinelor și ADN-ului. Mutațiile la nivel de ADN produc activa- rea proteinei p53, promotor de apoptoză la nivel de keratinocit, care are ca efect final distru- gerea structurii epiteliale. Keratinocitele iradiate eliberează citokine pro-inflamatorii și induc indirect activarea MMP-1 în fibroblaștii dermici. IL 1 $\alpha$  are un rol major în propagarea indirectă a acestor efecte.

Astfel, s-a demonstrat acțiunea extractelor: steroidic neglicozidat fluid și steroidic gli- cozidat fluid în patogeneza foto-îmbătrânirii printr-un screening al următorilor parametri celulari:

- inducerea apoptozei declanșată de modificări la nivel de ADN;
- stres oxidativ celular - activarea intracelulară a speciilor de oxigen reactive și a sistemului de conversie enzimatică al acestora: catalaza și superoxide dismutaza (SOD);
- status inflamator: secreția citokinelor pro-inflamatorii (IL6, IL8), a IL1- $\alpha$  ca indicator de sensibilizare și iritabilitate;
- secreția factorului VEGF (vascular endothelial growth factor) - promotor de angio- geneză - etapa cheie în refacerea țesutului cutanat degradat și vindecarea rănilor;

## RO 128905 B1

- 1 - modularea activității enzimelor degradative ale matrixului extracelular: metaloproteinaza 2 și 9 (MMP 2 și 9).
- 3 Centralizarea efectelor cumulative care stau la baza fotoprotecției este prezentată în tabelele de mai jos (comparativ cu martorul pozitiv N-acetilcisteina 10 mM).
- 5 Se constată un efect diferențiat al extractelor, fiecare acționând asupra altor căi de propagare a degenerării și inflamației induse de iradierea UV:
- 7 - extractul steroidic neglicozidat fluid - efect protector față de radiația UV-A, deci agent antiîmbătrânire efectiv, cu acțiune complexă atât la nivelul citokinelor inflamatorii și IL 1 $\alpha$ , cât și protector față de inducerea apoptozei; în condițiile iradierii UV-B are doar efect de stopare a inflamației și antiangiogenic, fără a influența apoptoza;
- 11 - extractul steroidic glicozidat fluid - nu influențează inducerea apoptozei, dar are efect antiinflamator pe ambele tipuri de iradiere, completat în cazul UV-B și de efectul antiangiogenic.
- 13



# RO 128905 B1

Substanța testată/Efect biologic	Iradiere UV-A													
	Protecție față de apoptoză				Inhibiție IL1 $\alpha$ (pg/ml)	Inhibiție VEGF (pg/ml)	Inhibiție Citokine pro-inflamatorii		Inhibiție stres oxidativ				Activare metallo-proteinaze MMP2si9	
	% celule vii	%celule apoptotice timpurii	% celule apoptotice târzii	% celule necrotice			IL8(pg/m 0	IL6(pg/ m 1)	Mediana canalului de fluorescență FITC-A (H2O2)	Mediana canalului de fluorescență PE-A (O2)	Catalaza UI/105 celule/ml	SOD UI/105 celule/ml	MMP2	MMP9
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
P4 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
P4 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
P2 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
P2 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 Cisteina 10 mM	71,1	23,3	5,3	0,2	289,85	320	1058	1208	7896	6254				

P2 = extract steroidic glicozidat fluid; P4 = extract steroidic neglicozidat fluid

1  
3  
5  
7  
9  
11  
13  
15  
17  
19  
21  
23

# RO 128905 B1

1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21	Substanța testată/efect biologic	Iradie UV-B													
		Protecție față de apoptoză				Inhibiție IL1 $\alpha$ (pg/ml)	Inhibiție Vegf (pg/ml)	Inhibiție Citokine pro-inflamatorii		Inhibiție stres oxidativ				Activare Metalo-proteinaze Mmp2si9	
		% celule vii	% celule apoptotice timpurii	%celule apoptotice târzii	%celule necrotice			IL8 (pg/ml)	IL6 (pg/ml)	Mediana canalului de fluorescență FITC-A (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Mediana canalului de fluorescență PE-A (O <sub>2</sub> ) <sub>1</sub>	Catalaza UI/10 <sup>5</sup> celule/ml	SOD UI/10 <sup>5</sup> celule/ml	MMP2	MMP9
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	
P4 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	
P4 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	
P2 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	
P2 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-AcetilCisteina IOMM	69,4	25,2	4,9	0,4	236,61	260	9775	4875	12445	7456					

P2 = extract steroidic glicozidat fluid; P4 = extract steroidic neglicozidat fluid

*Demonstrarea activității antiinflamatoare la nivel de endoteliu vascular*

1

Creșterea și turn-overul celulelor endoteliale în piele sunt fundamentale nu numai în cadrul dezvoltării normale, ci și în vindecarea rănilor, ciclul foliculilor piloși, metastaza celulelor tumorale și a diferitelor stadii ale patologiei cutanate. Există mai multe aspecte privind fiziologia vasculaturii dermice și implicarea acesteia în homeostazia țesutului cutanat. Dintre acestea, inflamația vasculară este cel mai important aspect, caracterizat de adeziunea între limfocit și endoteliu, declanșată de exprimarea unor molecule de adeziune - markeri de inflamație, și secreția de citokine pro-inflamatorii [G. Haraldsen, D. Kvale, B. Lien, I. N. 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 micro vascular endothelial cells** Laboratory for Immunohistochemistry and Immunopathology (LIPAT), Institute of Pathology, The National Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway].

3

5

7

9

11

13

Efectul antiinflamator la nivel vascular al extractului steroidic neglicozidat uscat a fost determinat pe linia endotelială HUVEC, cu următoarea aplicabilitate: în cadrul efectului anti-ageing - anti-fotoîmbătrânire, în procesul de combatere a inflamației și cicatrizare a leziunilor provocate de radiația UV (model experimental de stimulare cu TNF- $\alpha$ , 2ng/ml - stimul inflamator general), în cadrul efectului antiacneic - cunoscută fiind infecția bacteriană și inflamația în zonele afectate (model experimental de stimulare cu LPS 1  $\mu$ g/ml - stimul inflamator de origine bacteriană). Celulele au fost lăsate să adere 24 h, apoi tratate 48 h cu substanțele testate. Evaluările s-au făcut comparativ cu un martor pozitiv de Dexametazonă, un agent antiinflamator cunoscut, în concentrație de 0,6  $\mu$ g/ml [Wen Chieh CHEN, J. Yu-Yun LEE, Wen-Chuan HSIEH, **European Journal of Dermatology.**, Volume 12, Number 5, 445-8, September - October 2002]. S-a evaluat expresia proteică a VCAM-1 (vascular-cell-adhesion molecule) și ICAM-1 (intracellular-adhesion molecule) prin citometrie în flux: marcarea fluorescentă cu anticorpii corespunzători pentru ICAM-1 (APC Mouse Anti-Human CD5), respectiv, VCAM-1 (PE-Mouse Anti-Human CD 106). Rezultatele au fost analizate comparându-se media canalului de fluorescență APC, respectiv, PE pentru probele achiziționate. Rezultatele au fost comparate cu secreția citokinelor inflamatorii umane exprimate în pg/ml.

15

17

19

21

23

25

27

29

Rezultatele prezentate în tabelele de mai jos evidențiază faptul că extractul steroidic neglicozidat uscat este un bun agent antiinflamator în condițiile inflamației bacteriene (model experimental de stimulare cu LPS - polizaharid obținut din *Escherichia coli*), acționând invers doza - efect în intervalul de concentrații 20 nM  $\div$  5 nM, atât în sensul inhibării expresiei moleculei de adeziune ICAM, cât și al reducerii secreției IL6 și IL8, în special IL6. Acest efect recomandă utilizarea acestuia ca antiinflamator în tratamentul antiacneic, evitând cronicizarea inflamației (inhibă IL6). În cadrul efectului antiageing - anti-fotoîmbătrânire, în procesul de combatere a inflamației și cicatrizare a leziunilor provocate de radiația UV (model experimental de stimulare cu TNF- $\alpha$ ), extractul steroidic neglicozidat uscat acționează simultan asupra ICAM și a citokinelor IL6 și IL8, stopând progresia inflamației.

31

33

35

37

39

## RO 128905 B1

Substanța testată	Celule nestimulate				Celule stimulate LPS 1 µg/ml				Celule stimulate TNF alfa 2 ng/ml			
	ICAM (media canal fluorescent)	% variație	VCAM (media canal fluorescent)	% variație	ICAM (media canal fluorescent)	% variație	VCAM (media canal fluorescent)	% variație	ICAM (media canal fluorescent)	% variație	VCAM (media canal fluorescent)	% variație
Martor celular	10882,6		1366,9		13974,4	28,4	1287,0	-5,8	15697,5	44,2	1569,7	14,8
P5 20 nM	12036,1	10,6	1307,2	-4,4	13239,8	-5,3	1185,6	-7,9	12968,1	-17,4	1610,7	2,6
P5 10 nM	11857,3	9,0	1244,7	-8,9	12660,0	-9,4	1278,5	-0,7	15834,3	0,9	1159,6	-26,1
P5 5 nM	12115,3	11,3	1281,8	-6,2	12380,5	-11,4	1271,4	-1,2	16371,2	4,3	1161,5	-26,0
Dexa- metazonă 0,6 µg/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

P5 = extract steroidic neglicozidat uscat:

Substanța testată	Celule nestimulate				Celule stimulate LPS 1 µg/ml				Celule stimulate TNF alfa 2 ng/ml			
	IL6	% variație	IL8	% variație	IL6	% variație	IL8	% variație	IL6	% variație	IL8	% variație
Martor celular	2054,5		1446,6		8166,1	297,5	4819,5	233,2	8543,4	315,8	5547,2	283,5
P5 20 nM	7694,8	274,5	5161,7	256,8	6677,5	-18,2	4176,0	-13,4	6115,2	-28,4	4117,5	-25,8
P5 10 nM	6512,4	217,0	4234,6	192,7	4135,7	-49,4	3042,0	-36,9	8810,5	3,1	5137,0	-7,4
P5 5 nM	7550,4	267,5	4507,0	211,6	4049,1	-50,4	3129,9	-35,1	8411,6	-1,5	5124,7	-7,6
Dexametazonă 0,6 µg/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

P5 = extract steroidic neglicozidat uscat

<i>Demonstrarea activității antimicrobiene</i>	1
Colonizarea microbiană reprezintă unul dintre evenimentele esențiale care stau la baza patogenezei acneei. În culturile microbiene dezvoltate în condiții de aerobioză din leziuni cutanate pustulare și nodulochistice au fost izolate următoarele microorganisme: <i>Staphylococcus aureus</i> în 41% din cazuri, <i>S. epidermidis</i> în 53% și <i>Micrococcus spp.</i> în 45%, în timp ce din culturile anaerobe s-au izolat <i>S. aureus</i> în 39% din cazuri, <i>Propionibacterium acne</i> în 33% și <i>S. epidermidis</i> în 21% (Hassanzaadeh et al., 2007). Pentru evidențierea efectului antimicrobian, s-au ales ca microorganisme model 36 de specii aparținând genului <i>Staphylococcus</i> , evaluându-se potențialul antipatogenic al extractelor steroidic neglicozidat fluid și steroidic glicozidat fluid, după următoarele obiective:	3
- izolarea în cultură pură a unor microorganisme din specimene clinice de tip leziuni cutanate;	11
- testarea calitativă a activității antimicrobiene - metoda difuzimetrică adaptată (tehnica de lucru în spot);	13
- determinarea concentrației minime inhibitorii - metoda microdiluțiilor seriale binare;	15
- evaluarea influenței asupra capacității de aderență la substrat inert - metoda microtitrării, cu evaluarea spectrofotometrică a biomasei.	17
La testarea calitativă prin metoda difuzimetrică s-a evidențiat prezența unei inhibiții a creșterii microbiene la nivelul spotului de extract depus pe mediul de cultură însămânțat. Metoda nu permite o apreciere semicantitativă a activității antimicrobiene datorită profilului de difuziune necunoscut prin mediul de cultură al compușilor. S-a determinat concentrația minimă inhibitorie (CMI) pentru extractul steroidic glicozidat fluid de 8,12 mg/mL pentru <i>S. aureus</i> , respectiv, de 8,12 mg/mL pentru <i>S. epidermidis</i> , iar pentru extractul steroidic neglicozidat fluid, de 0,08 mg/mL pentru <i>S. aureus</i> , respectiv, 0,04 mg/mL pentru <i>S. epidermidis</i> . Pe de altă parte, extractul steroidic neglicozidat fluid nu influențează semnificativ expresia factorilor de virulență pentru tulpinile studiate ( <i>S. aureus</i> și <i>S. epidermidis</i> ). Extractul steroidic glicozidat fluid inhibă capacitatea de aderență la substrat inert a microorganismelor studiate.	19
În concluzie, extractele steroidic glicozidat fluid și steroidic neglicozidat fluid reprezintă o soluție în tratamentul antiacneic adjuvant, manifestând un efect antimicrobian asupra unor tulpini implicate în patogenitatea acestei boli.	21
Rezultatele obținute în urma studiilor de acțiune specifică <i>in vitro</i> , realizate pe linii celulare standardizate, susțin utilizarea extractelor cosmetic active, obținute prin valorificarea completă a plantei <i>Trigonella foenum graecum</i> în formulări de produse cosmetice dezvoltate pe baza proprietăților estrogen mimetice, de stimulare a ratei de proliferare celulară și sintezei de colagen, antiinflamatoare, antioxidante, antimicrobiene, fotoprotectoare față de radiația UV-A și UV-B și de restabilire a fermității și hidratării țesutului dermo-epidermic ale acestora.	23
<b>Exemplul 1</b>	25
<i>Procedeu de obținere a extractelor cosmetic active din Trigonella foenum graecum semen</i>	27
A. Obținerea extractului lipofil din semințe de schinduf - 10 kg materie primă vegetală semințe uscate și măcinate ale plantei <i>Trigonella foenum graecum</i> se introduc în instalația de extracție rapidă, ce are montată o buclă de recirculare, formată din două pompe centrifuge, și se supun extracției dinamice în același flux, primul solvent utilizat este acetona în raport 1:10, timp de 2 h/treaptă în instalația de extracție, la temperatura de 20°C, soluțiile extractive obținute în cantitate de 75 L se supun operațiilor de concentrare sub vid la 35°C, pentru recuperarea solventului, reintroducerea acestuia în sistemul de extracție și obținerea	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

# RO 128905 B1

1 extractului brut uleios în cantitate de 425 g, care se supune purificării prin filtrare și distilare  
înaintată sub vid, pentru eliminarea urmelor de apă și solvent de extracție, rezultând extractul  
3 lipofil din semințe de schinduf în cantitate de 390 g, cu un conținut în acizi grași esențiali  
mono- și polinesaturați  $\omega$ -3 și  $\omega$ -6 de 82%.

5 B. Obținerea extractelor steroidice glicozidate din semințe de schinduf. Masa vegetală  
existentă deja în vasul de extracție după efectuarea etapei A se extrage în continuare cu  
7 alcool etilic 85%, de calitate farmaceutică, în trei trepte, în raport 1:12, timp de 2 h/treaptă,  
la temperatura de 20°C, soluțiile extractive obținute în cantitate de 90 L se supun concentrării  
9 sub vid la temperatura de 35°C, pentru recuperarea solventului și reintroducerea acestuia  
în sistemul de extracție, iar extractul concentrat în raport 1/20 se condiționează prin intro-  
11 ducere sub vid în 5 kg glicerină, obținând extractul steroidic glicozidat fluid, sub forma unui  
lichid brun roșcat limpede, cu miros caracteristic, cu un conținut în saponine steroidice totale  
13 de 1,4 g/100 g, dozat spectrofotometric, și compuși flavonoidici de 0,17/100 g; pentru obți-  
nerea extractului steroidic glicozidat uscat, extractul concentrat în raport 1/20 se supune pre-  
15 cipitării în acetonă în raport 1:10, urmată de filtrarea și uscarea la 90°C, obținând 870 g  
17 pulbere portocalie, cu un conținut în saponine steroidice totale de 8,5% și compuși falvo-  
noidici de 1,8 g/100 g.

19 C. Obținerea extractelor steroidice neglicozidate din semințe de schinduf. Masa vege-  
tală rămasă în vasul de extracție după etapa B se supune extracției cu soluții hidroetanoliche  
21 60%, de calitate farmaceutică, în raport 1:15, în trei trepte, timp de 2 h/treaptă, la tempe-  
ratura de 20°C, soluțiile extractive obținute în cantitate de 110 L se supun concentrării sub  
23 vid la 30°C, recuperării solventului și reintroducerii acestuia în proces; extractul concentrat  
após, obținut în cantitate de 7,5 L, ce se găsește în instalația de concentrare, se supune  
25 operației de hidroliză acidă cu HCl 2N, sub vid, la 50°C, timp de 1 h; extractul hidrolizat  
obținut se neutralizează și se condiționează în 20 kg propilenglicol, obținând extractul  
27 steroidic neglicozidat fluid, cu un conținut în diosgenină 0,13 g/100 g, și în compuși polifeno-  
lici exprimați în acid cafeic, de 0,17 g/100 g; pentru obținerea extractului steroidic neglico-  
zidat uscat, extractul hidrolizat se neutralizează, se filtrează sub vid și se usucă la 90°C,  
29 obținând preparatul brut în cantitate de 220 g, cu un conținut în diosgenină de 8,9 g/100 g,  
din care, pentru a obține preparatul sub formă purificată, pulberea obținută se dizolvă în  
31 alcool etilic 96% sub vid, la reflux timp de 1 h, soluția obținută se purifică prin trecerea pe o  
coloană cu cărbune activ, se concentrează sub vid până la un raport 1/20, se filtrează, se  
33 usucă la 90°C, iar pulberea cafenie obținută în cantitate de 17 g are o concentrație de 63%  
în diosgenină.

35 D. Obținerea extractului polizaharidic din semințe de schinduf. Peste masa vegetală  
rămasă în vasul de extracție după etapa C, se introduc 250 L apă purificată încălzită la 40°C,  
37 în trei trepte, timp de 1 h/treaptă, soluțiile extractive obținute se răcesc la temperatura  
ambientă, se concentrează până la un volum de 25 L și sunt supuse precipitării, sub agitare  
39 50 L alcool etilic 96% (amestecul astfel obținut este menținut la rece la 4°C, 4 h); precipitatul  
alb, cu aspect de fuior, obținut se separă prin filtrare sub vid și se usucă în curent de aer cald  
41 la 65°C, obținându-se 2,3 kg extract polizaharidic sub forma unei pulberi gri-cafenii, cu un  
conținut de 87% fibre solubile.

43 E. Masa vegetală epuizată în componentele urmărite, obținută în cantitate de 6,3 kg,  
se ambalează în saci de rafie și se reciclează sub formă de compost, prin încorporarea în  
45 arătura din sol.

## Exemplul 2

47 Crema de zi

Formula de condiționare: . . . . . g/100 g

49 Poligliceril-3-metilglucoză distearat . . . . . 1,00

Glicerilstearat . . . . . 0,50

# RO 128905 B1

Alcool stearic . . . . .	0,80	1
Cetearilizonanoat . . . . .	2,00	
Caprilic/capric trigliceride . . . . .	3,00	3
Isopropilpalmitate . . . . .	2,00	
Ulei mineral . . . . .	5,00	5
Pentilenglicol . . . . .	3,00	
Squalene . . . . .	2,00	7
Glicerină . . . . .	3,00	
Carbomer . . . . .	0,60	9
Sodium Hydroxide . . . . .	0,03	
Extract fluid din <i>Trifolium pratense</i> . . . . .	0,50	11
Extract polizaharidic din <i>Trigonella foenum graecum</i> . . . . .	10,00	
Extract lipofil din <i>Trigonella foenum graecum</i> . . . . .	2,00	13
Parfum . . . . .	0,40	
Butil-hidroxianisole . . . . .	0,05	15
Apă ad. . . . .	100	
Produsul dermatocosmetic prezintă acțiune „estrogen-mimetică”, stimulează rata de proliferare celulară și sinteza de colagen, prezintă efect fotoprotector față de UV-A și UV-B, activitate antiinflamatoare și antioxidantă, restabilește fermitatea și hidratarea țesutului dermo-epidermic, fiind recomandat cu precădere pentru grupa de vârstă peste 45 de ani în terapia antiîmbătrânire.		17 19 21
<b>Exemplul 3</b>		
Loțiune antiacneică		23
Formula de condiționare: . . . . . g/100 g		
Alcool etilic . . . . .	6,00	25
Fenoxietanol și sorbat de potasiu . . . . .	0,80	
Pentilenglicol . . . . .	3,00	27
Glicerină . . . . .	5,00	
Alantoină . . . . .	0,20	29
Hidroxid de sodiu . . . . .	0,10	
Parfum . . . . .	0,10	31
Mentol . . . . .	0,02	
Extract fluid de <i>Viola tricolor</i> . . . . .	0,10	33
Extract fluid de <i>Centaurea cyanus</i> . . . . .	0,10	
Extract steroidic neglicozidat fluid din <i>Trigonella foenum graecum semen</i> . . . . .	0,15	35
Extract fluid de <i>Arctium lappa</i> . . . . .	0,20	
Sare disodică a acidului etiletetraaminoacetic . . . . .	0,03	37
Apă ad. . . . .	100	
Produsul dermatocosmetic prezintă acțiuni: de modulare hormonală în condiții de dezechilibru estrogenic, antimicrobiană, antiiritativă și antioxidantă, antiinflamatoare la nivel de micro-vasculatură și foto-protectoare, fiind recomandat pentru terapia antiacneică.		39 41

3 1. Procedeu de obținere a extractelor din *Trigonella foenum graecum semen*, **carac-**  
5 **terizat prin aceea că** semințele de schinduf, uscate și măcinate, se introduc în instalația de  
7 extracție rapidă, ce are montată o buclă de recirculare, formată din două pompe centrifuge,  
9 și se supun extracției dinamice în același flux, succesiv în patru trepte cu 4 solvenți cu pola-  
11 rități diferite: în prima etapă extracția se realizează cu acetonă în trei trepte, în raport  
13 1:5...1:10, timp de 1...2 h/treaptă, la temperatura de 18...25°C, soluțiile extractive se  
15 concentrează sub vid la 30...40°C, obținându-se extractul brut uleios, care se supune purifi-  
17 cării prin filtrare și distilare înaintată sub vid, rezultând uleiul purificat de schinduf, în cantitate  
19 de 30...70 g/kg semințe de schinduf, denumit extract lipofil, iar masa vegetală existentă deja  
21 în vasul de extracție se extrage în continuare cu alcool etilic 80...96%, în trei trepte, în raport  
23 1:8...1:12, timp de 1...2 h/treaptă, la temperatura de 18...25°C, soluțiile extractive obținute  
25 se supun concentrării sub vid la temperatura de 30...40°C, iar extractul concentrat este pre-  
27 lucrut fie prin condiționare în propilenglicol, glicerină sau butilenglicol, cu obținerea  
29 extractului steroidic glicozidat fluid în raport de 2:1...1:1 semințe schinduf:extract, fie extractul  
31 concentrat se suspendă în acetonă pentru precipitare, obținându-se extractul steroidic glico-  
33 zidat uscat în cantitate de minimum 8 g/100 g semințe schinduf; masa vegetală rămasă în  
35 vasul de extracție după etapa a doua se extrage cu soluții hidroetanolicе de concentrații  
40...70%, în raport 1:10...1:15, în trei trepte, timp de 2 h/treaptă, la temperatura de 18...25°C,  
45 soluțiile extractive obținute se supun concentrării sub vid la 30...40°C, extractul concentrat  
47 apos se supune operației de hidroliză acidă cu HCl 2N, sub vid, la 40...50°C, timp de 1 h;  
49 extractul obținut se neutralizează și se prelucrează fie prin includerea într-un solvent  
cosmetic, propilenglicol, glicerină, butilenglicol, obținând extractul steroidic neglicozidat fluid  
în raport 1:1...3:1 semințe de schinduf:extract, fie extractul neutralizat se filtrează și se  
usucă, obținând extractul brut în cantitate de minimum 20 g/kg semințe schinduf, din care,  
prin purificări succesive, se obține extractul steroidic neglicozidat uscat; extractul  
polizaharidic cu structură de galactomanani se obține prin extracția masei vegetale rămasă  
în vasul de extracție după etapa a treia, cu apă purificată la 30...60°C, în raport 1:25...1:50,  
în trei trepte, timp de 1 h/treaptă, soluțiile concentrate sunt supuse precipitării, în raport  
1:2...1:4 extract:alcool etilic 80...96%, v/v; amestecul astfel obținut este menținut la 4...8°C  
minimum 4 h; precipitatul alb obținut se separă prin filtrare sub vid și se usucă în curent de  
aer cald, obținându-se extractul polizaharidic în cantitate de minimum 200 g/kg semințe de  
schinduf, iar masa vegetală reziduală, ce se obține în cantitate de maximum 600 g/kg  
semințe de schinduf, se reciclează sub formă de compost, prin încorporare în arătura din sol.

37 2. Extract lipofil obținut prin procedeul definit în revendicarea 1, **caracterizat prin**  
39 **aceea că** are un conținut standardizat în acizi grași mono- și polinesaturați  $\omega$ -3 și  $\omega$ -6 de  
41 minimum 80%.

43 3. Extract steroidic glicozidat, obținut prin procedeul definit în revendicarea 1,  
45 **caracterizat prin aceea că** se prezintă sub formă fluidă în glicerină, propilenglicol sau  
47 butilenglicol, cu aspect de lichid brun roșcat limpede, cu miros caracteristic, standardizat în  
49 saponine steroidice totale de minimum 1% și compuși flavonoidici de minimum 0,15 g/100  
ml, sau sub formă uscată, cu aspect de pulbere portocalie, cu un conținut în saponine  
steroidice totale de minimum 8% și compuși flavonoidici de minimum 1,0 g/100 g.

45 4. Extract steroidic neglicozidat, obținut prin procedeul definit în revendicarea 1,  
47 **caracterizat prin aceea că** se prezintă sub formă fluidă în glicerină, propilenglicol sau  
49 butilenglicol standardizat în agliconi steroidici totali 0,2...0,3%, din care diosgenină  
0,1...0,15%, și în compuși polifenolici exprimați în acid cafeic de 0,15...0,2%, sau sub formă  
uscată, cu un conținut în diosgenină de 60...90%.



5. Extract polizaharidic cu structură de galactomanani, obținut prin procedeul definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** are un conținut standardizat în fibre solubile în apă de minimum 85%. 1  
3
6. Produse dermatocosmetice, **caracterizate prin aceea că** au în compoziție, ca substanțe biologic active, extractele obținute conform revendicării 1, și definite conform revendicărilor 2...5, individual sau asociate în diferite combinații și proporții, și anume: 0,5...3% extract lipofil și/sau 0,01...5% extract steroidic glicozidat și/sau 0,01...1% extract steroidic neglicozidat și/sau 1,15% extract polizaharidic, alături de alte ingrediente cosmetice, condiționate sub formă de cremă, mască și loțiune. 5  
7
7. Produse dermatocosmetice, conform revendicării 6, pentru utilizare în terapia anti-îmbătrânire. 9  
11
8. Produse dermatocosmetice, conform revendicării 6, pentru utilizare în terapia antiacneică. 13



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 582/2016