



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00747**

(22) Data de depozit: **27/09/2017**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2019** BOPI nr. **5/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. **5/2018**

(73) Titular:

- UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN BUCUREȘTI, STR. DIONISIE LUPU NR. 37, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- HOFIGAL EXPORT - IMPORT S.A., INTRAREA SERELOR NR. 2, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- DINU MIHAELA, STR. ȘOIMĂREȘTILOR NR. 19, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- ANUCEANU ROBERT VIOREL, STR. MOȚOC NR. 2, BL. P3, SC. 3, ET. 4, AP. 72, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- OLARU TUDOREL OCTAVIAN, STR. ZBOINA NEAGRĂ NR. 5, BL. 98, AP. 8, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- HOVANET MARILENA VIORICA, STR. CĂLIŢULUI NR. 13, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- ANGHIEL ADRIANA IULIANA, STR. SOLD. N. SEBE NR. 5, BL. S24, AP. 36, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- NEGREȘ SIMONA, ȘOS. GIURGIULUI NR. 121, BL. 5, SC. 2, AP. 44, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- ȘEREMET OANA CRISTINA, CALEA GIULEȘTI, NR. 43, BL. 14A, SC. 1, ET. 6, AP. 23, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- ZBÂRCEA CRISTINA ELENA, STR. CALEA VĂCĂREȘTI NR. 308, BL. 1E, ET. 2, AP. 12, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;

- DINU PÂRVU CRISTINA ELENA, STR. GH. LAZĂR NR. 10, ET. 1, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- ARSENE ANDREEA LETIȚIA, STR. ÎNVINGĂTORILOR NR. 19, ET. 1, AP. 2, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- DRĂGOI CRISTINA, STR. VETERANILOR NR. 10, BL. C2, ET. 4, AP. 49, X, RO;
- POPESCU CARMEN, STR. SOLD. ENE MODORAN NR. 14, BL. M185, SC. 1, ET. 2, AP. 11, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- DUNE ALINA, BD. CONSTANTIN BRÂNCOVEANU NR. 118, BL. MII/4, SC. 2, ET. 8, AP. 153, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- NIȚULESCU GEORGE MIHAI, ȘOS. OLTENIȚEI NR. 40-44, BL. 6A, SC. 4, ET. 7, AP. 145, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- BĂBEANU NARCISA, ȘOS. VIRTUȚII NR. 5, BL. K2, AP. 50, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- POPA OVIDIU, CALEA GRIVIȚEI NR. 206, BL. K, SC. D, AP. 26, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- LIVADARIU OANA, STR. POLONĂ NR. 228, OTOPENI, IF, RO;
- MANEA ȘTEFANIA, ALEEA BACĂU NR. 9, BL. H1, SC. 1, ET. 4, AP. 78, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- NICOLAE ALINA CRENGUȚA, STR. EPIGONILOR NR. 110, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
KR 20110012974 A; KR 20160114811 A

(54) **EXTRACT SELECTIV DE MORUS ALBA L.
PENTRU TRATAMENTUL DERMATITEI ATOPICE,
ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTUIA**



1 Prezența invenției se referă la un extract vegetativ selectiv, pentru abordarea terapeutică
a dermatitei atopice, și la formularea acestuia pentru administrare topică.

3 Dermatozele sunt afecțiuni mediate imunologic ale epidermei. Acestea se manifestă prin
urticarie și eczeme/dermatite. Datorită complexității mecanismelor implicate și numeroaselor
5 cauze care determină răspunsul imun și declanșarea acestor afecțiuni, tratamentul disponibil
vizează simptome comune în dermatoze, și anume: prurit, inflamație și eritem (**Steinhoff M.,
7 Cevikbas F., Yeh I., Chong K., Buddenkotte J., Ikoma A. Evaluation and management of
a patient with chronic Pruritus, J. Allergy Clin Immunol, 2012: 1015-6; Hong J.,
9 Buddenkotte J., Berger T., Steinhoff M., Management of Itch in Atopic Dermatitis, Semin
Cutan Med Surg 30:71-86; Peyron J. L. Management of atopic dermatitis, Revue française
11 d'allergologie et d'immunologie clinique. 2006; 46 S18-21).**

Terapia topică reprezintă o componentă fundamentală în arsenalul dermatologilor.
13 Produsele topice reprezintă varianta de primă alegere de către dermatologi, datorită riscului
scăzut de reacții adverse, comparabil cu medicația sistemică. În funcție de componente,
15 aplicarea de preparate topice urmărește trei aspecte: refacerea barierei naturale a pielii cu
emoliente, tratarea inflamației și a pruritului cu agenți antiinflamatori - corticosteroizi specifici,
17 inhibitori de calcineurină și gudron, și alți agenți antipruriginoși, fără mecanism direct asupra
inflamației - mentol, N-palmitoletanolamină, capsaicină, doxepină și naltrexonă (**Thiers B.H.,
19 Topical steroid therapy of atopic skin diseases., Allergy Proc. 1989; 10:413-416; Eschler
D. C., Klein P. A., An evidence-based review of the efficacy of topical antihistamines in
21 the relief of pruritus, J Drugs Dermatol, 2010; 9:992-997; Kempers S., Boguniewicz M.,
Carter E., et al. A randomized investigator-blinded study comparing pimecrolimus cream
23 1% with tacrolimus ointment 0,03% in the treatment of pediatric patients with moderate
atopic dermatitis, J Am Acad Dermatol, 2004; 51:515-525; Hong J., Buddenkotte J.,
25 Berger T., Steinhoff M., op. cit; Schneider L., Tilles S., Lio P., Boguniewicz M., Beck L.,
LeBovidge J., Novak N., MD, Atopic dermatitis: A practice parameter update 2012, J
27 Allergy Clin Immunol. 2013;131:295-9; Garnacho-Saucedo G., Salido-Vallejo R., Moreno-
Gimenez J. C., Atopic Dermatitis: Update and Proposed Management Algorithm, Actas
29 Dermosifiliogr. 2013; 104(1):4-16). Refacerea și menținerea în stare funcțională a barierei
epidermice este importantă în primul rând pentru a limita pierderea de apă de la nivelul
31 celulelor, și în al doilea rând pentru a preveni pătrunderea alergenilor care, altfel, ar agrava
simptomele (**Ong P. Y., Boguniewicz M., Investigational and unproven therapies in atopic
33 dermatitis, Immunol Allergy Clin North Am. 2010;30: 425-439; Ong PY: Emerging drugs
for atopic dermatitis. Expert Opin Emerg Drugs. 2009; 14: 165-179). Indirect, folosirea
35 emolienților adecvați, conduce la reducerea pruritului și a inflamației locale (Cheong W.:
Gentle cleansing and moisturizing for patients with atopic dermatitis and sensitive skin.
37 Am J Clin Dermatol. 2009; 10(1): 13-17). În același timp emolientele reprezintă un vehicul
pentru medicamentele antiinflamatoare (**Msika P., De Belilovsky C., Piccardi N., et al. New
39 emollient with topical corticosteroid-sparing effect in treatment of childhood atopic
dermatitis: SCORAD and quality of life improvement. Pediatr Dermatol. 2008; 25: 606-612;
41 Grimalt R., Mengeaud V., Cambazard F., Study Investigators Group. The steroid-sparing
effect of an emollient therapy in infants with atopic dermatitis: A randomized controlled
43 study. Dermatology. 2007; 214: 61-67). Unele dintre cele mai noi vehicule includ acidul
hialuronic (**Ong PY: op. cit; Boguniewicz M., Zeichner J. A., Eichenfield L. F., et al.
45 MAS063DP is effective monotherapy for mild to moderate atopic dermatitis in infants and
children: A multicenter, randomized, vehicle-controlled study. J Pediatr. 2008;152: 854-
47 859), amestecuri de ceramide, colesterol și acizi grași care mimează stratul cornos (**Madaan**********

A., Epiceram for the treatment of atopic dermatitis. Drugs Today (Bare). 2008; 44: 751-755) sau creme/emulsii cu uree în concentrație de 5% (Wiren K., Nohlgård C., Nyberg F., et al. Treatment with a barrierstrengthening moisturizing cream delays relapse of atopic dermatitis. A prospective and randomized controlled clinical trial. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2009; 23: 1267-1272).

Glucocorticosteroizii topici sunt frecvent folosiți ca agenți antiinflamatori în tratamentul dermatitelor. Cu toate că aceștia nu sunt recomandați ca tratament de primă alegere, sunt foarte utili în recidive și în formele grave. Cei mai utilizați sunt corticosteroizii halogenați (betametazonă 0,1%, fluocinolon 0,025%, triamcinolon 0,025/0,1%) în unguente sau, mai rar, geluri, și hidrocortizonul (în concentrație de 1%). Reacțiile adverse comune sunt cele locale (formarea de striuri, atrofierea și subțierea pielii, ulcerări, acnee, telangiectazie), reacții sistemice fiind foarte rar raportate (Furue M., Terao H., Rikihisa W., Urabe K., Kinukawa N., Nose Y., Koga T., **Clinical dose and adverse effects of topical steroids in daily management of atopic dermatitis, British Journal of Dermatology, 2003; 148(1): 128-133**). Inhibitorii de calcineurină (tacrolimus 0,1 și 0,03% și pimecrolimus 1%) reprezintă opțiuni de tratament relativ noi. Administrarea acestora pe cale cutanată a condus la rezultate satisfăcătoare din punct de vedere al eficacității (Hanifin J. M., Ling M. R., Langley R., et al. **Tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in adult patients: part I, Efficacy. J Am Acad Dermatol 2001; 44(1): S28-S38; Palier A. S., Lebwohl M., Fleischer A. B. Jr, et al. Tacrolimus ointment is more effective than pimecrolimus cream with a similar safety profile in the treatment of atopic dermatitis: Results from 3 randomized, comparative studies. J Am Acad Dermatol. 2005; 52: 810-822; Hon K. L., Lam M. C., Leung T. F., et al. Assessing itch in children with atopic dermatitis treated with tacrolimus: Objective versus subjective assessment. Adv Ther. 2007; 24: 23-28**), datele privind siguranța la administrare îndelungată sunt mai limitate (Siegfried E. C., Jaworski J. C., Kaiser J. D., Hebert A. A., **Systematic review of published trials: long-term safety of topical corticosteroids and topical calcineurin inhibitors in pediatric patients with atopic dermatitis, BMC Pediatr. 2016 Jun 7;16:75. doi: 10.1186/s1-887-016-0607-9**) și există rezerve la utilizarea lor din cauza riscului de infecții la locul de aplicare, și îngrijorărilor privind un potențial risc de malignități (Silverberg J. I., Nelson D. B., Yosipovitch G., **Addressing treatment challenges in atopic dermatitis with novel topical therapies. J Dermatolog Treat. 2016; 27(6): 568-576**).

Mai recent, s-au investigat agenți antiinflamatori inovatori de tipul "oligodeoxinucleotidelor topice momeală (decoy)", implicate în blocarea legării factorilor de transcripție la regiunile promotoare ale genelor implicate în procesul inflamator (Ong P. Y., Boguniewicz M: **op. cit; Igawa K., Satoh T., Yokozeki H., A therapeutic effect of STAT6 decoy oligodeoxynucleotide ointment in atopic dermatitis: A pilot study in adults, Br J Dermatol. 2009; 160: 1124-1126**), suplatast tosilatul (inhibitor al sintezei de citokine de către limfocitele Th2 în combinație cu tacrolimus) (Miyachi Y., Katayama I., Furue M., et al. **Suplatast//tacrolimus combination therapy for refractory facial erythema in adult patients with atopic dermatitis: A meta-analysis study. Allergol Int. 2007; 56: 269-275; Chase E. P., Armstrong A. W., Advances in Management of Atopic Dermatitis: New Therapsies and Novei Uses of Existing Treatments, Semin Cutan Med Surg. 2012; 31: 17-24**). Aceștia au dovedit o oarecare eficacitate în tratamentul antiinflamator din dermatite, dar nu au fost încă autorizați pentru utilizare în practica clinică. Administrarea de doxepină sub formă de cremă 5% prezintă un efect relativ scăzut, comparativ cu antihistaminicele orale, și poate conduce la reacții adverse - ușoară somnolență, senzație de arsură, uneori chiar exacerbarea simptomelor

RO 132539 B1

1 dermatitei (Drake L. A., Millikan L. E., The Antipruritic Effect of 5% Doxepin Cream in
2 Patients With Eczematous Dermatitis, *J AM A Dermatology*, 1995, 131(12): 1403-1408;
3 Hoare C., Li W., Po A., et al. Systematic review of treatments for atopic eczema. *Health*
4 *Technol Assess.* 2000; 4:1-191; Bonnel R. A., La Grenade L., Karwoski C. B., et al. Allergic
5 contact dermatitis from topical doxepin: Food and Drug Administration's postmarketing
6 surveillance experience. *J Am Acad Dermatol.* 2003; 48: 294-296). Naltrexona administrată
7 cutanat a produs o scădere a pruritului de 29,4%, comparativ cu placebo, nefiind totuși aprobată
8 în prezent pentru tratamentul dermatitei atopice (Bigliardi P. L., Stammer H., Jost G, et al.
9 **Treatment of pruritus with topically applied opiate receptor antagonist.** *J Am Acad*
10 *Dermatol.* 2007; 56: 979-988). N-palmitoletanolamina acționează pe receptorii canabinoidici,
11 având acțiune antiinflamatoare și analgezică (Dvorak M., Watkinson A., McGlone F., et al.
12 Histamine induced responses are attenuated by a cannabinoid receptor agonist in human skin.
13 *Inflamm Res.* 2003; 52: 238-245). În urma administrării unei creme cu 0,3% N-palmitole-
14 tanolamină la pacienți (2456) cu dermatită atopică, s-a observat o ameliorare a simptomelor
15 dermatitei atopice (uscarea pielii cu lichenificare, eritem, prurit) după aproximativ 6 zile,
16 evaluarea făcându-se însă fără un grup de control (Eberlein B., Eicke C., Reinhardt H. W., et
17 al. **Adjuvant treatment of atopic eczema: Assessment of an emollient containing N-**
18 **palmitoylethanolamine (ATOPA study),** *J. Eur Acad Dermatol Venereol*, 2008; 22: 73-82).
19 Mentolul 16% este util în prurit. Chiar dacă mecanismul de acțiune al mentolului nu este încă
20 pe deplin elucidat, în practică se utilizează sub formă de suspensii sau geluri (maximum 16%);
21 o explicație ar fi acțiunea asupra canalelor TRMP8, care, în urma activării fibrelor A-delta,
22 stimulează activarea receptorilor k opioizi (Peier A. M., Moqrich A., Hergarden A. C., et al. **A**
23 **TRP channel that senses cold stimuli and menthol.** *Cell.* 2002; 108: 705-715; Galeotti N.,
24 Di Cesare M. L., Mazzanti G., et al. **A natural analgesic compound.** *Neurosci Lett.* 2002;
25 322: 145-148). Totuși, are reacții adverse care includ, pe lângă eritem local, senzație de arsură,
26 uscarea pielii și dermatită de contact (Hattem S., Attal N., Willer J. C., et al. **Psychophysical**
27 **study of the effects of topical application of menthol in healthy volunteers.** *Pain.* 2006;
28 122: 190-196; Yosipovitch G., Szolar C., Hui X. Y., et al. **Effect of topically applied menthol**
29 **on thermal, pain and itch sensations and biophysical properties of the skin.** *Arch*
30 *Dermatol Res.*, 1996; 288: 245-248). În urma evaluării eficacității capsaicinei la pacienți cu
31 *prurigo nodularis*, aceasta a condus la înlăturarea pruritului după 12 zile (Ständer S., Luger T.,
32 Metzger D. **Treatment of prurigo nodularis with topical capsaicin.** *J Am Acad Dermatol*,
33 2001; 44: 471-478). Capsaicina se leagă de canalele ionice TRPV1, conducând la depleția
34 depozitelor de neuropeptide și desensibilizarea receptorilor la nivelul fibrelor C (Dray A.,
35 **Neuropharmacological mechanisms of capsaicin and related substances.** *Biochem*
36 *Pharmacol.* 1992; 44: 611-615). Reacțiile adverse includ senzație de arsură, eritem și
37 intensificarea pruritului. Terapia cu capsaicină este de ultimă alegere; este recomandată
38 începerea cu doze de 0,025% sau 0,006% (în zone sensibile), și creșterea graduală a acestora
39 (Gooding S. M., Canter P. H., Coelho H. F., et al. **Systematic review of topical capsaicin**
40 **in the treatment of pruritus,** *Int. J. Dermatol.* 2010; 49: 858-865).

41 Efectele adverse care însoțesc tratamentul topic sunt însemnate, acestea uneori limitând
42 utilizarea medicamentelor existente. Plantele medicinale reprezintă alternativa terapeutică la
43 tratamentele descrise anterior. Cu toate că au fost raportate efecte adverse la administrarea
44 topică a plantelor medicinale, efectele sunt de intensitate redusă, și pot fi controlate prin
45 obținerea unor extracte cu reacții adverse minime sau chiar lipsite de toxicitate (Amagai Y.,
46 Katsuta C., Nomura Y., Oida K., Matsuda K., Jang H., Ahn G., Hamasaki T., Matsuda H.,
47 Tanaka A., **Amelioration of atopic-like skin conditions in NC/Tnd mice by topical**

application with distilled *Alpinia intermedia* Gagnep extracts. *J Dermatol.* 2017 Aug 16. doi: 10.1111/1346-8138. 13995; Epub ahead of print; Wang K., Coyle M. E., Mansu S., Zhang A. L., Xue C. C., *Gentiana scabra* Bunge. Formula for Herpes Zoster: Biological Actions of Key Herbs and Systematic Review of Efficacy and Safety. *Phytother Res.* 2017 Mar;31(3): 375-386. doi: 10.1002/ptr.5769; Hashempur M. H., Ghasemi M. S., Daneshfard B., Ghoreishi P. S., Lari Z. N., Homayouni K., Zargaran A., Efficacy of topical chamomile oii for mild and moderate carpal tunnel syndrome: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Complement Ther Clin Pract.* 2017 Feb;26: 61-67. doi: 10.1016/j.ctcp.2016.11.010). În continuare prezentăm speciile vegetale și biocompușii cu acțiune antialergică la administrare topică.

Biocompușii responsabili de acțiunea antialergică. Principalele clase de fitocompuși prezente în produse dermatocosmetice cu acțiune antipruriginoasă, antieritematoasă și antiinflamatoare sunt: lipidele, compușii fenolici, iridoidele și alcaloizii (Burlando B., Verotta L., Cornara L., Bottini-Massa E., *Herbal Principles in Cosmetics: Properties and Mechanisms of Action*, CRC Press, Boca Raton, 2010, p. 37).

Lipidele (uleiurile vegetale), prin aplicare topică, pe lângă acțiunea emolientă, exercită și o serie de efecte biologice specifice: antiinflamator, antieczematos și cicatrizant; în afară de aceste efecte, lipidele vegetale constituie vehicule importante pentru substanțele active, în special cele lipofile (Ibid). Astfel, uleiul de *Helianthus annuus*, untul de cacao din *Theobroma cacao* și uleiul de mango (*Mangifera indica*) sunt bogate în acid linoleic. Acesta este util în tratarea leziunilor psoriazisului (asemănătoare cu cele din dermatita atopică). Ceara lichidă de jojoba (*Simmondsia chinensis*) favorizează penetrarea steroizilor în straturile inferioare ale epidermei; uleiurile grase obținute din semințele de *Borago officinalis*, *Plukenetia volubilis* și *Oenothera biennis* au un conținut crescut de acizi grași polinesaturați (în special ω -3 α -linolenic și ω -6 linoleic), cu acțiune antieczematoasă. Totuși, îmbunătățirea scorurilor în dermatita atopică a fost demonstrată statistic numai la administrarea sistemică, la administrarea topică observându-se ameliorarea simptomelor, fără a fi semnificativă însă din punct de vedere statistic, comparativ cu placebo (World Health Organization, *WHO monographs on selected medicinal plants*, vol. 2, 2002, p. 217).

Compușii fenolici sunt prezenți în specii vegetale superioare (*Dicotyledonatae* și *Monocotyledonatae*). Cu toate acestea, polifenolii variază din punct de vedere calitativ și cantitativ de la o specie la alta. Administrarea topică a extractelor vegetale cu polifenoli în tratarea dermatitelor s-a dovedit a fi benefică. În acest sens s-a demonstrat că extractul etanolic 70% (cu conținut bogat în acid shikimic) din fructele de *Illicium verum*, aplicat topic, a inhibat dezvoltarea leziunilor induse la șoareci NC/Nga, și a scăzut nivelul seric de IgE și de histamină. Consecutiv acestui efect, s-a înregistrat și o scădere a citokinelor, chemokinelor și moleculelor de adeziune (Sung Y.-Y., Yang W.-K., Lee A. Y., Kim D.-S., Nho K. J., Kim Y. S., Kim H. K., *Topical application of an ethanol extract prepared from Illicium verum suppresses atopic dermatitis in NC/Ngamice*, *Journal of Ethnopharmacology.* 2012;144, 151-159). Un alt compus fenolic, epigallocatechin-3-galatul, unul dintre biocompușii principali din frunzele de *Camellia sinensis*, aplicat direct pe leziunile induse pe model experimental la animal, a redus semnificativ, comparativ cu martorul, eritemul, edemul, lichenificarea și leziunile cutanate. Rezultatele au fost totuși inferioare celor obținute cu unguentul cu *tacrolimus* 0,1%. În același timp s-a înregistrat scăderea semnificativă a citokinelor produse de celulele Th₂ (Up S, Cho N, Kim HO, Park YM. *Epigallocatechin-3-gallate improves Dermatophagoides pteronissinus extract-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice by suppressing macrophage migration inhibitory factor*, *International Immunopharmacology.* 2008; 8: 1172-1182).

1 *Houttuynia cordata* și *Ulmus davidiana* var. *japonica* sunt alte două specii bogate în polifenoli,
care au prezentat acțiune antialergică la administrarea topică într-un gel pe bază de alcool
3 polivinilic (Lim Y. M., An S.-J., Kim H.-K., Kim Y.-H., Youn M.-H., Gwon H.-J., Shin J., Nho
Y.-C, **Preparation of hydrogels for atopic dermatitis containing natural herbal extracts by
5 gamma-ray irradiation, Radiation Physics and Chemistry. 2009; 78: 441-144**). Constituenții
majori din *Houttuynia cordata* sunt quercitrina, quercetolul și hiperozida (Tian L., Shi X., Yu L.,
7 Zhu J., Ma R., Yang X., **Chemical composition and hepatoprotective effects of
polyphenol-rich extract from Houttuynia cordata tea, J Agric Food Chem. 2012 60(18):
9 4641-8**), iar în *Ulmus davidiana* var. *japonica* sunt taninurile catehice și sesquiterpenele (Jung
M. J., Heo S II, Wang M. H., **Free radical scavenging and total phenolic contents from
11 methanolic extracts of Ulmus davidiana, Food Chemistry. 2008; 108: 482-487; Kim Y. C.,
Lee M. K., Sung S. H., Kim S. H., Sesquiterpenes from Ulmus davidiana var. japonica with
13 the inhibitory effects on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production, Fitoterapia,
2007, 78(3): 196-199**). Frunzele de *Psidium guajava* sunt utilizate tradițional pentru acțiunea
15 antiinflamatoare și cicatrizantă (Gutierrez R. M., Mitchell S., Solis R.V., **Psidium guajava: a
review of its tradițional uses, phytochemistry and pharmacology, J. Ethnopharmacol.
17 2008; 117: 1-27**). Acțiunea antiinflamatoare a fost demonstrată *in vitro* și *in vivo* (șoarece) de
Seo et al.(2005); mecanismul propus este de reglare a raportului Th1/Th2 prin creșterea Th1
19 (Seo N., Ito T., Wang N., Yao X., Tokura Y., Furukawa F., Takigawa M., Kitanaka S., **Anti-
allergic Psidium guajava extracts exert an antitumor effect by inhibition of T regulatory
21 cells and resultant augmentation of Th1 cells. Anticancer Res. 2005; 25: 3763-3770**). La
administrarea topică a extractului apos din frunze (ale speciei *P. guajava*) în experimente pe
23 șoareci, rezultatele din studiile anterior menționate au fost confirmate (Choi J. H., Park B. H.,
Kim H. G., Hwang Y. P., Han E. H., Jin S. W., Seo J. K., Chung Y. C., Jeong H. G.,
25 **Inhibitory effect of Psidium guajava water extract in the development of 2,4-
dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice, Food and Chemical
27 Toxicology. 2012; 50: 2923-2929**). Principalii biocompuși identificați sunt taninurile (8,5%),
flavonoidele (miricetol - 208,44 mg/Kg, quercetol - 2883,08 mg/Kg, luteol - 51,22 mg/Kg și
29 kaempferol - 97,25 mg/Kg), alături de uleiuri volatile, steroli și rezine (Perez Gutierrez R. M.,
Mitchell S., Vargas Solis R., **Psidium guajava. A review of its tradițional uses,
31 phytochemistry and pharmacology, Journal of Ethnopharmacology. 2008; 117: 1-27**). Nu
au fost încă efectuate studii clinice privind această acțiune topică. Nepetina, jaceosidina și hispi-
33 dulina sunt flavonoide izolate din partea aeriană de *Eupatorium arnottianum*, a căror activitate
antiinflamatoare a fost demonstrată în modele experimentale la șoarece (Clavin M.,
35 Gorzalczany S., Macho A., Muñoz E., Ferraro G., Acevedo C., Martino V., **Anti-
inflammatory activity of flavonoids from Eupatorium arnottianum, Journal of
37 Ethnopharmacology. 2007; 112: 585-589**). Alte specii vegetale pentru care s-a demonstrat
acțiunea antialergică/antiinflamatoare (a polifenolilor) la administrare topică pe animale de
39 laborator sunt: *Tanacetum parthenium* (Martin K., Sur R., Liebel F., et al: **Parthenolide-depleted Feverfew
(Tanacetum parthenium) protects skin from UV
41 irradiation and external aggression. Arch Dermatol Res. 2008; 300: 69-80**). *Cayaponia
tayuya* (Aquila S., Giner R. M., Recio M. C, Spegazzini E. D., Rios J. L., **Anti-inflammatory
43 activity of flavonoids from Cayaponia tayuya roots, Journal of Ethnopharmacology.
(2009); 121: 333-337**) și *Hamamelis virginiana* (**Anti-inflammatory activity of hamamelis
45 distillate applied topically to the skin, European Journal of Clinical Pharmacology, 1993,
44(4): 315-318**).

RO 132539 B1

Iridoidele sunt biocompuși care au dovedit eficacitate în tratarea leziunilor dermatitei atopice pe model experimental la animal. Liofilizatul obținut din extractul metanolic de rădăcină de *Sophora flavescens* inhibă degranularea mastocitelor în experimentele *in vitro* și *in vivo* (șoarece) (Kim H., Lee M. R., Lee G. S., An W. G., Cho S. I., **Effect of Sophora flavescens Aiton extract on degranulation of mast cells and contact dermatitis induced by dinitrofluorobenzene in mice, Journal of Ethnopharmacology. 2012; 142: 253-258**). O altă specie verificată ca potențială alternativă terapeutică în dermatita atopică este *Catalpa ovata*. În urma aplicării topice a unui unguent cu 1 și, respectiv, 2% extract din scoarță, la ambele concentrații au fost înregistrate îmbunătățiri ale valorilor markerilor biochimici și ale scorurilor farmacologice, neputând însă a fi corelată concentrația cu efectele observate. Activitatea antiinflamatoare a extractului a fost pusă pe seama iridoidelor (Yang G., Choi C. H., Lee K., Lee M., Ham I., Choi H. Y., **Effects of Catalpa ovata stern bark on atopic dermatitis-like skinlesions in NC/Ngamice, Journal of Ethnopharmacology, 2013; 145: 416-423**), identificate de Lino von Poser et al. (2000); Jeong. et al. (2002) au evidențiat acțiunea antiinflamatoare *in vivo* a iridoidelor din *Rehmannia glutinosa*, iar Sung et al. (2011) acțiunea antialergică pe model animal de dermatita atopică, (Jeong H. J., Koo H. N., Na H. J., Kim M. S., Hong S. H., Eom J. W., Kim K. S., Shin T. Y., Kim H. M., **Inhibition of TNF-alpha and IL-6 production by Aucubin through blockade of NF-kappaB activation RBL-2H3 mast cells. Cytokine. 2002; 18: 252-259**; Sunga Y.-Y., Yoona T., Janga J. Y., Parkb S.-J., Kima H. K., **Topical application of Rehmannia glutinosa extract inhibits mite allergen-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice Journal of Ethnopharmacology, 2011; 134: 37-44**. Specia conține iridoide, în special aucubină (Oshio H., Inouye H., **Iridoid glycosides of Rehmannia glutinosa, Phytochemistry, 1982; 21, 133-138**).

Polifenolii din specii aparținând diferitelor familii (*Solanaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Rosaceae, Liliaceae, Orchidaceae* etc.) (Kang M. A., Choung S. Y., **Solanum tuberosum L. ev Hongyoung extract inhibits 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice, Mol Med Rep. 2016;14(4): 3093-103**; Son H. U., Lee S., Heo J. C., Lee S. H., **The solid-state fermentation of Artemisia capillaris leaves with Ganoderma lucidum enhances the anti-inflammatory effects in a model of atopic dermatitis, Int J Mol Med., 2017;39(5): 1233-1241**; Kawahara T., Tsutsui K., Nakanishi E., Inoue T., Hamazu Y., **Effect of the topical application of an ethanol extract of quince seeds on the development of atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice, BMC Complement Altern Med. 2017 Jan 31; 17(1): 80**; Kim B., Choi Y. E., Kim H. S., **Eruca sativa (Brassicaceae) and its flavonoid components, quercetin and isorhamnetin, improve skin barrier function by activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-α and suppression of inflammatory cytokines. Phytother. Res. 2014 Sep; 28(9): 1359-66**; Park K. H., Jeong M. S., Park K. J., Choi Y. W., Seo S. J., Lee M. W., **Topical application of Rosa multiflora root extract improves atopic dermatitis-like skin lesions induced by mite antigen in NC/Nga mice. Biol Pharm Bull. 2014;37(1): 178-83**; Finberg M. J., Muntingh G. L., van Rensburg C. E., **A comparison of the leaf gel extracts of Aloe ferox and Aloe vera in the topical treatment of atopic dermatitis in Balb/c mice. Inflammopharmacology, 2015 Dec; 23(6): 337-41**; Wu C. T., Huang K. S., Yang C. H., Chen Y. C., Tsay H. S., **Inhibitory effects of cultured Dendrobium tosaense on atopic dermatitis murine model. International Journal of Pharmaceutics, 2014;463(2): 193-200**), obținuți fie din alimentație, fie prin aplicarea pe piele, pot ameliora simptomele și pot inhiba dezvoltarea diferitelor afecțiuni ale acesteia. Ei reprezintă un instrument promițător în tratarea sau ameliorarea diferitelor afecțiuni ale pielii. De

1 aceea recent au apărut numeroase rapoarte privind terapia afecțiunilor cutanate cu compuși
 2 dintr-un extract, sau combinații de compuși sau extracte provenite de la diferite specii (**Dzialo**
 3 **M., Mierziak J., Korzun U., Preisner M., Szopa J., Kulma A., The Potențial of Plant**
Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders, Int J Mol Sci. 2016; 17(2): 160).

5 Fructele diferitelor specii cunoscute tradițional pentru tratarea inflamației edemului au
 6 fost utilizate pentru obținerea unor extracte. Efectele acestora sau ale diferitelor fracțiuni au fost
 7 investigate la șoarecii NC/Nga expuși la extractul *Dermatophagoides farinae*. Aplicarea topică
 8 a extractului *F. suspensa* și a constituentului său, matairezanolul, a redus în mod eficient
 9 simptomele AD. Rezultate bune s-au obținut și în cazul extractului din fructe de *Gardenia*
 10 *jasminoides* și a genipozidei. Deci acestea ar putea fi soluții terapeutice pentru tratarea
 11 tulburărilor inflamatorii alergice, cum ar fi AD (**Sung Y. Y., Lee A. Y., Kim H. K., Forsythia**
 12 **suspensa fruit extracts and the constituent matairesinol confer anti-allergic effects in an**
 13 **allergic dermatitis mouse model Journal of Ethnopharmacology, 2016; 187: 49-56; Sung**
 14 **Y. Y., Lee A. Y., Kim H. K., The Gardenia jasminoides extract and its constituent,**
 15 **geniposide, elicit anti-allergic effects on atopic dermatitis by inhibiting histamine in vitro**
 16 **and in vivo, Journal of Ethnopharmacology, 2014; 156: 33-40).**

17 Multe specii vegetale au fost investigate pentru potențialul terapeutic în dermatită
 18 atopică, fie singure, fie sub diferite formulări. Astfel, pentru formula cunoscută în China ca Pei
 19 Tu Qing Xin Tang (PTQXT), care conține *Radix Pseudostellariae*, *Forsythia suspensa*, *Ramulus*
 20 *Uncariae cum Uncis*, *Medulla Junei*, *Herba Lophatheri*, *Semen Coicis*, *Rhizoma Dioscoreae*,
 21 *Concha Ostreae*, *Radix Glycyrrhizae*, a fost demonstrată eficacitatea în reducerea severității
 22 bolii, și îmbunătățirea calității vieții pacienților cu dermatită atopică, severă sau moderată (**Liu**
 23 **J., Mo X., Wu D., Ou A., Chen D., Efficacy of a Chinese herbal medicine for the treatment**
 24 **of atopic dermatitis: A randomised controlled study, Complementary Therapies in**
 25 **Medicine. 2015; 23(5): 644-651). O altă formulă cunoscută în medicina tradițională chineză,**
 26 Huang-Lian-Jie-Du decoct (HLJDD), asociază *Coptidis rhizoma* (Huang-Lian), *Scutellariae radix*
 27 (Huang-Qin), *Phellodendri Chinensis cortex* (Huang-Bai) și *Gardenia fructus* (Zhi-Zi) într-un
 28 studiu *in vitro*, și demonstrează efectele antiinflamatoare și antialergice semnificative ale
 29 acestuia, prin suprimarea producției de mediatori alergici și inflamatoare prin inactivarea NF-κB
 30 și MAPK și degradarea IκBα în celulele RAW24.7 stimulate cu LPS, pe calea inactivării MAPK
 31 și Lyn în celulele RBL-2H3 antigen induse (**Chen Y., Xian Y., Lai Z., Loo S., Lin Z. X., Anti-**
 32 **inflammatory and anti-allergic effects and underlying mechanisms of Huang-Lian-Jie-Du**
 33 **extract: Implication for atopic dermatitis treatment, Journal of Ethnopharmacology, 2016;**
 34 **185: 41-52). Asocierea a două specii *Saussurea costus* (*Aucklandia lappa* Decne, *Aucklandiae*
 35 *Radix-Asteraceae*, SC) și *Thuja orientalis* L. (TOL), utilizate în mod tradițional ca agenți
 36 antiinflamatori în Coreea, a fost verificată comparativ cu extractele plantelor separate, în aten-
 37 nuarea simptomelor dermatitei atopice prin aplicare locală. Extractele asociate standardizate
 38 (SC în acid clorogenic, iar TOL în catechină și apigenină) au ameliorat simptomele AD prin
 39 reducerea activității pro-inflamatorii și a răspunsurilor imune supraactivate. Rezultatele sugerează
 40 că asocierea celor două extracte poate fi o alternativă mai eficientă în managementul
 41 dermatitei atopice (**Yang H. J., Kim M. J., Kang S., Moon N. R., Park S., Topical treatments**
 42 **of *Saussurea costus* root and *Thuja orientalis* L. synergistically alleviate atopic**
 43 **dermatitis-like skin lesions by inhibiting protease-activated receptor-2 and NF-κB**
 44 **signaling in HaCaT cells and Nc/Nga mice, Journal of Ethnopharmacology, 2017; 199: 97-**
 45 **105). Însă nu întotdeauna asocierea are rezultate mai bune. Astfel, rezultatele unui alt studiu**
 46 **au dus la concluzia că tratamentul cu o combinație de trei plante: *Eleutherococcus*, *Achillea***
 47 ***millefolium* și *Lamium album*, deși scade rapid simptomele AD și induce o rată ridicată de****

remisiune parțială, nu diferă de efectele placebo. Prin urmare, cercetătorii care au desfășurat 1
 studiul nu susțin utilizarea clinică a acestei combinații de trei plante (**Shapira M. Y.,** 3
Raphaelovich Y., Gilad L., Or R., Dumb A. J., Ingber A., Treatment of atopic dermatitis
with herbal combination of Eleutherococcus, Achillea millefolium, and Lamium album 5
has no advantage over placebo: A double blind, placebo-controlled, randomized trial. J
Am Acad Dermatol, 2005; 52: 691-3).

Au fost înregistrate o serie de brevete care se referă la obținerea unor noi forme 7
 farmaceutice cu efect antialergic, utile în tratamentul unor patologii cutanate diverse (dermatită 9
 atopică, eczema, urticarie). Harry A. Dugger (2007) a constatat că o combinație a unui anti- 9
 histaminic cu un corticosteroid este mai eficientă în remiterea simptomelor de dermatită atopică 11
 (Dugger H. A., Antihistamine/Corticosteroid preparations for the treatment of atopic dermatitis, 11
US 20090136430 A1, 2007).

Pentru tratamentul dermatitei atopice a fost realizată o combinație de polividonă-lipozomi 13
(Fleischer W., Reimer K., Use of PVP-iodine liposomes for treatment of atopic dermatitis, 13
EP 1449521 A1, 2003). Masahiko Kuroda et al. (2010) au demonstrat eficacitatea celulelor stem 15
 în această afecțiune (**Kuroda M., Takanashi M., Sudo K., Yamauchi S., Therapeutic** 15
composition for atopic dermatitis, US 20110070207 A1, 2010). Diverși compuși au fost 17
 testați și propuși ca tratament al dermatitei atopice: xantină (**Eitan A., Nachman R., Cohen S.,** 17
Composition for topical treatment of psoriasis and atopic dermatitis comprising a 19
xanthine derivative, US 5565462 A, 1994), antagonist de interleukin-4 (**Adeleanu M.,** 19
Methods for treating atopic dermatitis by administering an il-4r antagonist, EP 2892927 21
A1, 2013), rafinoză (**Matsuda M., Takeuchi S., Nagura T., Aritsuka T., Kouji S. Anti-atopic** 21
dermatitis composition, US 5994326 A, 1998), glucozamină (**Kim S.-Y., A composition for** 23
treatment of atopic dermatitis comprising glucosamine and derivatives thereof and a 23
method for treatment of atopic dermatitis using them WO 2008048076 A1, 2008), 1-kestoză 25
 (Koga Y., Rumiko Shibata, Yuji Aiba, Yasunori Fukumori, Hiroyuki Takeda, 1-kestose for 27
 treating allergy and atopic dermatitis, **EP 1878738 B1, 2006),** violet de gențiană (**Rosenberg** 27
E. W., Skinner R. B., Jr. Use of gentian violet in treatment of atopic dermatitis, 2007), acizi 29
 polinesaturați cu lanț lung (LC-PUFA) (**Secretin M.-C, Infant or follow-on formula, WO** 29
2004112507 A1, 2004) sau steviolglicozide (**Yukinaga N., Norihiro T., Kanae W., Hiroshi A.,** 31
Antiallergic agent containing steviol glycoside, JP 2006213726, 2006).

Sung Sick Woo et al. (2012) au brevetat o combinație din două extracte obținute din 33
Bambus sp. și *Scutellaria sp.* pentru tratamentul și prevenirea dermatitei atopice prin inhibarea 33
 eliberării histaminei și leucotrienelor (**Woo S. S., Kim D. S., Lee Y. C., Son E. J., Composition** 35
for treating atopic dermatitis comprising extracts of bamboo and scutellaria, US 8771761 35
B2, 2012). Un alt brevet se referă la tratamentul afecțiunilor alergice cu pulbere obținută din 37
 frunzele de *Psidium guajava* (**Hamada S., Kitanaka S., Method of treatment of atopic** 37
dermatitis with dried guava leaves, US 5942231 A, 1996). De asemenea, a fost brevetat 39
 (2010) un remediu vegetal conținând o combinație de extracte obținute din *Sophora sp.*, 39
Glycyrrhiza glabra, *Lonicera sp.*, *Angelica sp.*, *Aralia sp.*, *Saussurea sp.*, *Seselos sp.* (rădăcină), 41
Zizyphus spinosus, *Houttuynia cordata*, *Forsythia sp.* (fruct), *Epimedium koreanum Nakai*, *Panax* 41
ginseng, *Lithospermum sp.*, *Cnidium sp.*, *Scrophularia sp.* și *Fallopia sachalinensis* (**Jin Yeul** 43
Ma et al. Composition for preventing or treating atopic dermatitis including galenical 43
extract or lactobacillus fermentation thereof, US 9295704 B2, 2010). Efecte antiinflamatoare 45
 s-au constatat pentru extractul obținut din *Abeliophyllum distichum Nakai* (**Jeong Jin Boo, Park** 45
Gwang Hun, Eo Hyun J. I., Song Hun Min, Development of antiatopic dermatitis targeted 47
Products using ABELIOPHYLLUM DISTICHUM NAKAI, KR 20160089256 (A).

1 Chiang Zuan-Hsiang (2014) a realizat lipozomi care conțin acid lactic combinat cu
2 extracte vegetale (**Chiang Z. H., Dual sphere liposome structure of lactic acid combined**
3 **with organic plant extracts for treatment and prevention of atopic dermatitis, eczema,**
4 **heat rash, child diaper rash, acne and other skin inflammation, TWM483083, 2014**). Kim
5 Jeoung Hyoun a brevetat o combinație de trei extracte (*Houttuynia cordata*, *Centella asiatica*
6 și *Glycyrrhiza glabra*), cu efecte benefice în dermatită atopică (**Kim J. H., Lee H. J., Lim Y. M.,**
7 **Gwon H. J., Kim C. M., Chou S. S., Methods for preparing microgel containing capsuled**
8 **atopic dermatitis treatment composition, KR 101418084, 2014**). Eficientă în tratarea acestei
9 afecțiuni s-a dovedit combinația a patru extracte obținute din *Ulmus davidiana*, *Cassia*
10 *obtusifolia*, *Taraxacum platycarpum* și *Prunus salicina* (**Chung H. K., Cho S. M., Kim H. S.,**
11 **Park K. M., Han S. H., Yeum K. J., Composition of matter having plant extract to improve**
12 **atopic dermatitis, KR 20090101600**). Pentru efectul antidermatitic au fost brevetate
13 următoarele extracte vegetale: *Rhododendron mucronulatum* (**Nam P., Lee S., Nam Y.,**
14 **Composition for treatment of atopic dermatitis, including natural plant extract, KR**
15 **20070079641, 2007**) și *Momordica charantia* (**Tachibana Hirofumi, Fujimura Yuki, Okubo**
16 **Hiroshi, Ozaki Yukio, Histamine release inhibitor, WO 2007111294, 2007, Vitis sp. și**
17 **Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc (Suwa A., Yasuhiro K., Composition for Prophylaxis**
18 **or treatment of allergic dermatitis, JP 2002047193, 2002**). Combinația extractelor obținute
19 din rădăcină de *Lindera sp.*, *Scutellaria sp.*, *Achyranthis sp.* și *Asiasarum sp.*, semințe de
20 *Theobroma cacao*, fruct de *Citrus aurantium*, lujeri de *Mucuna birdwoodiana*, scoarță de
21 *Cinnamomum sp.* și *Magnolia sp.*, frunze de *Geranium thunbergii* a demonstrat un efect
22 antialergic prin inhibarea eliberării histaminei (**Yukinaga N., Naba Yoshohiko, Antiallergic**
23 **agent, JP 2000169383, 2000**). Același efect antihistaminic a fost experimentat și pentru
24 *Copaiba multijuga Hayne*, *Operculina altissima Meissn*, *Symphytum officinale Linne* (**Yukinaga**
25 **N., Norihiro T., Shinko K., Kanae W., Hiroshi A., External preparation for skin and Bathing**
26 **agent, JP H07278001 (A), 1995, Rubus palmatus și Momordica grosvenorii (Yukinaga N.,**
27 **Norihiro T., Antiallergic drug containing plant extract, JPH 1053532, 1998**).

28 Problema pe care o rezolvă invenția de față se referă la un extract selectiv de *Morus*
29 *alba L.* și la evaluarea proprietăților antialergice în vederea utilizării ca tratament dermic, și la
30 un procedeu de obținere a extractului vegetal caracterizat calitativ și cantitativ, și evaluarea
31 capacității antialergice prin model experimental pe șoarece.

32 Extractul selectiv vegetal, obținut din *Morus alba* și standardizat în polifenoli totali și
33 flavonoide totale, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că este
34 caracterizat printr-un conținut de polifenoli totali exprimați în acid galic de 0,60...4,69 g%, și un
35 conținut de flavonoide totale exprimate în quercetol de 1,18...1,59 g%.

36 Procedeu de obținere a unui extract selectiv vegetal din *Morus alba*, conform invenției,
37 înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că va cuprinde următoarele etape:

38 - se extrag principiile active prin extracția la reflux de 1...2 ori a produsului vegetal cu
39 etanol 50% în raport de 1:10, timp de 30...60 min, se filtrează la presiune scăzută, se
40 concentrează soluțiile extractive la evaporator rotativ la temperatură scăzută de 50°C, se usucă
41 extractul prin liofilizare;

42 - se purifică prin fracționarea extractului total pe coloană deschisă cu fază staționară de
43 silicagel 60 70...230 mesh, 63...200 μm și solvent în gradient treptat de eter etilic:acetat de etil,
44 acetat de etil:metanol și metanol: 1% acid acetic în metanol; gradient: 100:0, 25:80, 50:50,
45 75:25 și 0:100, cu colectarea fracțiunii finale eluate cu solventul metanol: 1% acid acetic în
proporție de 1:1.

RO 132539 B1

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:	1
- materia primă vegetală se obține din culturi biologice;	
- obținerea extractului vegetal se face utilizând solvenți convenabili;	3
- extractul vegetal selectiv este obținut printr-un procedeu cu un randament bun de extracție a principiilor active;	5
- extractul vegetal selectiv obținut prezintă proprietăți antialergice, și oferă o alternativă terapeutică pentru tratamentul dermatitei alergice;	7
- extractul vegetal selectiv poate fi ușor încorporat într-un preparat de uz topic.	
Extractul vegetal purificat din frunzele de <i>Morus alba L.</i> Are un conținut de polifenoli totali exprimați în acid galic de 0,60...4,69 g%, și un conținut de flavonoide totale exprimate în quercetol de 1,18...1,59 g%. Procedeu conform invenției presupune obținerea unui extract total, și purificarea prin fracționare a acestuia pe coloană. Procedeu de obținere a extractului total, conform invenției, presupune extracția la cald de 1...2 ori, timp de 30...60 min, a produsului vegetal cu amestec de alcool etilic și apă în proporție de 1:1, în raport cantitativ volum material vegetal:solvent de 1:10, urmată de concentrarea la evaporator rotativ, și uscarea prin liofilizare.	9
Procedeu de purificare, conform invenției, presupune fracționarea extractului total pe coloană deschisă (d = 30 mm, L = 500 mm) cu fază staționară de silicagel 60 70...230 mesh, 63...200 μm și solvent în gradient treptat: 100:0, 25:75, 50:50, 75:25 și 0:100. Au fost folosite următoarele perechi de solvenți: eter etilic:acetat de etil, acetat de etil:metanol și metanol:1% acid acetic în metanol; cu colectarea fracțiunii finale eluate cu solventul metanol:1% acid acetic în proporție de 100:0...0:100. Procedeu de fracționare se poate extinde utilizând solvenți de tipul eter etilic:acetonitril, acetat de etil:diclometan și diclometan:1% acid acetic în etanol.	11
Pentru caracterizarea calitativă a extractului, s-au efectuat amprente prin spectrometrie infraroșu (IR) și cromatografie de lichide (HPLC), iar pentru caracterizarea cantitativă s-au efectuat dozări spectrofotometrice de polifenoli totali și flavonoide totale. Extractul selectiv a fost testat <i>in vivo</i> (la șoarece), pentru efectul de reducere a hipersensibilității întârziate în dermatite de tip alergic.	13
În continuare sunt prezentate 4 exemple de realizare a invenției, în legătură cu figurile ce reprezintă:	15
- fig. 1, amprenta IR a extractului selectiv de <i>Morus alba L.</i> ;	17
- fig. 2, evaluarea acțiunii antialergice a extractului selectiv de <i>Morus alba L.</i> ;	19
- fig. 3, profilul reologic pentru hidrogelul experimental cu extract vegetal selectiv.	21
Exemplul 1	23
Descrierea etapelor de obținere a extractului selectiv de <i>Morus alba L.</i> :	25
<i>Etapa I. Prelucrarea materiei prime (produsul vegetal)</i>	27
Frunzele de <i>Morus alba L.</i> se recoltează dintr-o cultură ecologică permanentă (de preferință în perioada mai-iunie), desprinderea frunzelor de pe ramurile tinere făcându-se prin strunjire. După recoltare frunzele sunt supuse procesului de uscare. Materia rezultată, denumită în continuare produs vegetal, conține mai puțin de 0,5% impurități provenite din alte specii vegetale, și mai puțin de 1,5% impurități provenite din aceeași plantă. Materialul vegetal uscat a fost măcinat și trecut prin sita de 2 mm; pentru extracție s-a păstrat materialul reținut de sita de 1 mm.	29
<i>Etapa II. Obținerea extractului total intermediar</i>	31
Extracția s-a realizat la cald de 1...2 ori timp de 30...60 min a produsului vegetal cu amestec de alcool etilic și apă în proporție de 1:1, în raport cantitativ volum material vegetal:solvent de 1:10, urmată de concentrarea la evaporator rotativ (Ingos RVO 004, Cehia) și uscarea prin liofilizare. Randamentul de obținere a extractului total a fost de 14,21%, cu un conținut de polifenoli totali exprimați în echivalenți acid galic de 7,33 g%, și un conținut de flavonoide totale exprimate în echivalenți quercetol de 2,39 g%.	33

RO 132539 B1

1 *Etapa III. Obținerea extractului selectiv*

2 Extractul total s-a supus fracționării pe coloană deschisă (d = 30 mm, L= 500 mm), cu
3 fază staționară de silicagel 60 70...230 mesh, 63...200 μm și solvent în gradient treptat: 100:0,
4 25:75, 50:50, 75:25 și 0:100. Au fost folosite următoarele perechi de solvenți: eter etilic:acetat
5 de etil, acetat de etilmetanol și metanol:1% acid acetic în metanol. S-au colectat fracțiuni pentru
6 fiecare treaptă de gradient, iar fracțiunile eluate cu solventul metanol:1% acid acetic în proporție
7 s-au reunit. Soluțiile reunite anterior au fost concentrate la evaporator rotativ (Ingos RVO 004,
8 Cehia), și uscate prin liofilizare. Randamentul de obținere a extractului selectiv a fost de
9 36,82%, cu un conținut de polifenoli totali exprimați în echivalenți acid galic de 2,64 g%, și un
10 conținut de flavonoide totale exprimate în echivalenți quercetol de 1,38 g%.

11 *Etapa V. Condiționarea extractului selectiv liofilizat*

12 Extractul obținut a fost condiționat în flacoane din sticlă brună cu dop din pvc, bine
13 închise, la întuneric, și conservat la temperatura camerei.

Exemplul 2

14 Caracterizarea extractului selectiv de *Morus alba L.*

Identificarea prin spectrometrie IR

15 Spectrele IR au fost efectuate în pulbere solidă, folosind un spectrometru JASCO
16 FT/IR4200 echipat cu un accesoriu ATR PRO450. Analizele s-au efectuat dublu, în domeniul
17 spectral 400...4000 cm⁻¹, analizând prezența grupelor funcționale. S-a măsurat coeficientul de
18 corelare interspectrală pentru a dovedi caracterul unitar al extractului selectiv, comparativ cu
19 extractul total. Rezultatele au fost prelucrate cu ajutorul softului Spectra Manager v.2.

20 Analiza IR a extractului selectiv de *Morus alba L.* indică prezența polifenolilor totali
21 (fig. 1). De asemenea, spectrul prezintă o regiune de amprentă caracteristică extractului
22 selectiv, regiune diferită de spectrul extractului total. Coeficientul de corelare dintre cele două
23 spectre este de numai 0,60, confirmând o compoziție chimică selectivă.

Identificarea prin HPLC

24 0,010 g extract selectiv se dizolvă în 10 ml etanol. Soluțiile se centrifughează la
25 6000 rpm (Centurion C2), și se folosește supernatantul filtrat în prealabil printr-un filtru de
26 0,22 μm. Au fost aplicate metode specifice HPLC pentru acizii fenolici și flavonoide, conform
27 protocolului descris de Dinu și colab., 2016, cu unele modificări. S-a utilizat un sistem pentru
28 cromatografie lichidă HPLC-DIONEX, pompă P580 și detector UVD 340U-șir de diode. S-a
29 utilizat o coloană Zorbax SB-18 (150 mm x 4,6 mm i.d. 3,5 μm, HiChrom) la 25°C, și o fază
30 mobilă (faza A: metanol:acetonitril 1:1 cu 1% acid formic; faza B: apă cu 1% acid formic) în
31 gradient liniar. Debitul a fost de 1 ml/min, iar volumul de injecție de 20 μL. Detecția s-a realizat
32 la 369 nm pentru flavonoide, și 320 nm pentru acizii fenolici.

33 În extractul selectiv au fost identificați următorii polifenoli: acid clorogenic (TR = 6,55),
34 kaempferol (TR = 19,60) și quercetol (TR = 26,2).

Determinarea cantitativă a principiilor active

35 Analiza principiilor active antioxidante - polifenoli totali exprimați în echivalenți de acid
36 galic și flavonoide totale - s-a efectuat prin metode spectrofotometrice cantitative. 0,020 g
37 extract (exemplul 1) se dizolvă în 10 ml etanol 50%. Soluțiile se centrifughează la 6000 rpm
38 (Centurion C2), și se folosește supernatantul. Volume corespunzătoare de supernatant se
39 folosesc pentru determinarea polifenolilor totali la 750 nm, și a flavonoidelor totale la 430 nm,
40 conform procedurii descris de Olaru OT și colab., 2015.

41 Extractul selectiv prezintă un conținut de polifenoli totali exprimați în acid galic de
42 0,60...4,69 g%, și un conținut de flavonoide totale exprimate în quercetol de 1,18...1,59 g%.

Exemplul 3

Evaluarea acțiunii antialergice topice a extractului selectiv de Morus alba L.

S-a evaluat eficacitatea extractului selectiv de *Morus alba L.* (300 µg/20 µl) în tratament topic, cronic, în model experimental de hipersensibilizare de contact indusă de 2,4-dinitrofluorobenzen la șoareci BALB/c/Br de sex feminin (Christensen A. D., Skov S., Haase C., The role of neutrophils and G-CSF in DNFB-induced contact hypersensitivity in mice, Immun Inflamm Dis. 2014 Jun; 2(1): 21-34).

Animale: șoareci femele, BALB/c/Br, cu vârsta de 6-8 săptămâni, având greutatea de 21,12 ± 1,21 g (N = 20), proveniți de la INCDMI CANTACUZINO Filiala Băneasa. Șoarecilor li s-a oferit acces la hrană și la apă *ad libitum*. Temperatura și umiditatea relativă au fost menținute la 21...24°C, respectiv, 45...60% pe tot parcursul experimentului, și determinate cu ajutorul unui higrometru. Toate procedurile au fost efectuate respectând normele de bioetică în cercetarea pe animale de experiență în scop științific, conform Legii 43/2014, privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, și Directivei 2010/63/UE, a Parlamentului European și a Consiliului, din 22 septembrie 2010, privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice.

Substanțe utilizate. Extractul selectiv de *Morus alba L.* s-a aplicat topic sub formă de suspensie obținută prin suspendare în acetonă/ulei de măsline în raport 4:1 (A/UM), în concentrație 0,15% (300 µg/20 µl), și s-a păstrat la frigider (2...8°C).

S-a utilizat ca referință soluție obținută prin dizolvare de dexametazonă bază (Zentiva - România) în A/UM în concentrație 0,0375% (75 µg/20 µl), și s-a păstrat la frigider (2...8°C). Pentru faza de sensibilizare s-a utilizat soluție de 2,4-dinitrofluorobenzen (Sigma-Aldrich, Germania) 0,5% în A/UM, iar pentru faza de elucidare, soluție de 2,4-dinitrofluorobenzen 0,2% în A/UM.

Metode utilizate: hipersensibilizarea în urma contactului cu 2,4-dinitrofluorobenzen - s-a utilizat modelul experimental de hipersensibilizare de contact, descris de Gaspari et. al., 2001, utilizând ca alergen 2,4-dinitrofluorobenzen (DNFB).

Protocol experimental. În ziua a-5 (Z₋₅) animalelor li s-a îndepărtat blana în zona dorsală (tunse până la piele). Șoarecii au fost împărțiți în 4 loturi a câte 5 animale/lot, care au fost tratate. S-a evaluat hipersensibilitatea prin măsurarea grosimii urechii cu ajutorul unui șubler digital (micrometru), cu sensibilitate de 0,01 mm. S-a determinat grosimea inițială a celor două urechi, după 24 h de la aplicare alergenului la nivelul urechii și la diferite momente ale experimentului.

Rezultate experimentale și calcul statistic. Calculul statistic s-a realizat utilizând GraphPad Prism versiunea 5.00 pentru Windows, (GraphPad Software - San Diego, California, SUA, www.graphpad.com). Stabilirea normalității s-a făcut utilizând testul D'Agostino & Pearson. Pentru compararea grupurilor s-au utilizat testele parametrice: ANOVA (compară n-grupuri), urmat de post test Dunnett (când se compară cu valoarea inițială de răspuns) sau post test Bonferroni (când se compară cu lotul martor), și testele neparametrice: Kruskal-Wallis (compară n-grupuri), urmat de post test Dunn's (când se compară cu valoarea inițială de răspuns sau cu un alt lot).

Rezultate

Modificarea urechii stângi pe parcursul experimentului, față de grosimea urechii drepte, respectiv, grosimea urechii stângi, precum și modificarea grosimii urechii stângi față de lotul M, respectiv, lotul DEX sunt redată în graficele de mai jos.

Pentru animalele din lotul martor nu se observă modificări semnificative în ceea ce privește grosimea urechii stângi față de grosimea urechii drepte. Astfel vehiculul utilizat, A/UM, nu modifică parametrul (grosimea urechii) prin care se evaluează edemul produs de reacția alergică determinată de DNFB. În urma măsurării grosimii urechii stângi cu ajutorul micro-

1 metrului digital, pentru lotul DNFB, se observă valori mai mari ale mediei/lot atât față de urechea
dreaptă, cât și față de valorile lotului M. Acestea apar încă din ziua 6, și devin semnificative
3 statistic din ziua 12 (vs UD 153,01%, $p < 0,05$; vs M 155,58%, $p < 0,001$) și ziua 14 (vs UD
212,20%, $p < 0,015$; vs M 212,20%, $p < 0,001$). Astfel se evidențiază reacția de hipersensibilizare
5 indusă de DNFB în zilele 12 și 14. În urma administrării topice a dexametazonei
(75 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$), se înregistrează creșteri reduse ale grosimii urechii stângi, comparativ cu
7 grosimea urechii drepte și cu valorile măsurate la animalele din lotul martor. Comparativ cu lotul
DNFB (martorul pozitiv), dexametazona a redus apariția reacției de hipersensibilizare întârziate,
9 efect semnificativ statistic în ziua 8 (-42,37%), $p < 0,01$; ziua 10 (-126,79%, $p < 0,001$); și ziua
12 (-142,87%, $p < 0,05$). Aceste rezultate confirmă eficacitatea corticosteroizilor aplicați topic
11 în fenomene de hipersensibilizare datorată contactului cu alergeni.

În urma aplicării topice a extractului selectiv de *Morus alba L.* s-au înregistrat creșteri
13 ale grosimii urechii stângi comparativ cu grosimea urechii drepte și cu grosimea măsurată la
șoarecii din lotul martor. Acestea au fost semnificative statistic, în zilele 12 și 14 (vs UD:
15 144,87%, $p < 0,01$ și 163,64%, $p < 0,001$; vs M: 147,44%, $p < 0,001$ și 163,64%, $p < 0,01$).

Comparativ cu lotul DNFB (martorul pozitiv) apare reducerea reacției de hipersensibilizare
17 întârziată, în toate zilele de testare. Procentele cele mai mari se înregistrează în ziua
10 (-69,65%) și ziua 14 (-48,56%).

19 Urmărind modificarea grosimii urechii stângi pe parcursul experimentului, față de
grosimea urechii drepte, se observă o alură lineară asemănătoare efectului dexametazonei.

21 Rezultatele experimentale confirmă potențialul extractului selectiv de *Morus alba L.* la
utilizarea ca tratament topic în afecțiuni cu componentă alergică.

23 Extractul selectiv (300 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) reduce pe tot parcursul experimentului reacția de
hipersensibilizare întârziată. În urma acestui experiment putem afirma că eficacitatea extractului
25 selectiv din frunze de *Morus alba L.* (300 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) se datorează existenței mai multor principii
active, care, la asociere, realizează un sinergism.

27 **Exemplul 4**

29 *Obținerea unui hidrogel cu utilizare topică, având ca substanță activă extractul selectiv
de Morus alba L.*

31 Hidrogelul s-a preparat conform formulei din tabelul 1. Într-un pahar Berzelius se disper-
sează 1 g Carbopol 940 în 60 ml apă distilată, și se lasă la hidratare timp de 24 h. S-au adăugat
apoi alcoolii, pe rând, în mici volume aduse alternativ și sub agitare continuă în baza de gel.

33 4,5 g din extractul selectiv de *Morus alba L.* se dispersează în 10 g glicerină, peste care
se aduce în porțiuni mici baza de gel, sub continuă agitare. S-a definitivat neutralizarea folosind
35 0,2 g trietanolamină, până la un pH de 6,5...6,7. Gelul a fost adus la masa constantă de 100 g,
adăugându-se restul de apă distilată. Incorporarea extractului selectiv de *Morus alba L.* în baza
37 de gel s-a realizat prin amestecare mecanică lentă (25 rpm) la agitator (Velp Scientifia type BS),
și a fost continuată timp de 10 min după aducerea la masă constantă a hidrogelului experi-
39 mental.

S-a caracterizat hidrogelul obținut din punct de vedere al proprietăților reologice și
41 capacității de etalare (Suhaimi IHB, Minaketan T., Mohamed M. S., Abdul Majeed A. B., *The
pharmaceutical applications of carbomer*, Asian Journal of Pharmaceutical Sciences and
43 Research, 2012, 2(2): 1-15). Viscositatea a fost măsurată în funcție de viteza de forfecare
aplicată. Condițiile experimentale au fost menținute constante în timpul desfășurării
45 măsurătorilor. S-a urmărit revenirea de la cea mai mare valoare a tensiunii de forfecare la cea
mai mică valoare, pentru a verifica tixotropia gelului. Temperaturile de lucru selectate au fost

RO 132539 B1

37,0 ± 0,1 °C (temperatura corpului) și 23,0 ± 0,1 °C (temperatura de conservare a hidrogelurilor). 1
 Profilul reologic corespunzător ramurii ascendente a graficului viscozitate în funcție de viteză 2
 de forfecare este reprezentat spre exemplificare în fig. 3, la temperaturile de 23 °C și 37 °C. Din 3
 examinarea reogramei se constată că gelul prezintă o comportare neneutroniană, pseudo- 4
 plastică la ambele temperaturi. 5

Tabelul 1 7

Compoziția hidrogelului

Codul formulării	Compoziția	Cantitatea (g)
G2	Carbopol 940	1
	Alcool etilic	10
	Propilenglicol	10
	Glicerină	12
	TEA	0,2
	Apă distilată	q.s. ad 100

Pentru cuantificarea comportării pseudoplastice a formulării topice testate se utilizează 19
 modelul legii puterii, care exprimă relația între viscozitate și viteză de forfecare. Acest model 20
 reologic se exprimă sub forma ecuației: 21

$$\eta = m \cdot \dot{\gamma}^{-n}$$

unde m și n sunt parametri corelați cu factorii de formulare ai hidrogelurilor testate, și sunt 23
 determinați prin liniarizarea ecuației (1) prin metoda dublei logaritmări. Se poate aprecia că 24
 valoarea lui m corespunde viscozității obținute pentru valoarea vitezei de forfecare de 1 · s⁻¹ 25
 (logaritmul pentru viteza de forfecare egală cu 1 este zero).

Valorile parametrilor reologici m și n descriși anterior, cât și a coeficientului de 27
 determinare R² specific modelului ce descrie relația dintre viscozitate și viteză de forfecare sunt 28
 înscrise în tabelul 2. Valorile coeficienților de determinare R² obținute prin aplicarea modelului 29
 reologic al legii puterii arată că datele experimentale, la cele două temperaturi, verifică acest 30
 model. 31

Tabelul 2 33

Valorile parametrilor m și n și ale coeficientului de determinare specifici modelului legii 34
 puterii aplicate hidrogelului testat la 23 °C și 37 °C 35

Hidrogel	23 °C			37 °C		
	m	n	R ²	m	N	R ²
G2	129,093	0,887	0,9998	104,607	0,917	0,9996

Pentru fiecare set de date reologice s-a evidențiat și aria de tixotropie, determinată la 39
 23 °C și 37 °C, arie corespunzătoare transformării gelului în fluid, cu pierderea viscozității, 40
 respectiv, revenirii la starea de gel cu refacerea viscozității pierdute. Tixotropia apare deoarece 41
 hidrogelul necesită o perioadă finită de timp pentru recuperarea viscozității inițiale, respectiv, 42
 pentru refacerea structurii originale care s-a distrus în timpul măsurătorilor de forfecare 43
 continue.

RO 132539 B1

1 Examinarea reogramelor viscozitate în funcție de viteza de forfecare, respectiv, a
reogramelor tensiune de forfecare în funcție de viscozitate arată că hidrogelul testat prezintă
3 o comportare neneutroniană, pseudoplastică, respectiv, tixotropă la ambele temperaturi (23°C
și 37°C). Caracterul pseudoplastic este demonstrat de scăderea viscozității la creșterea tensiunii
5 de forfecare, respectiv, vitezei de forfecare; iar caracterul tixotrop este demonstrat de faptul că,
pentru aceeași viteză de forfecare, punctele de pe curbele de revenire corespund la tensiuni
7 de forfecare mai joase decât de pe curbele directe. La aceeași viteză de forfecare se constată
că viscozitatea este mai mică la 37°C decât la 23°C, ceea ce demonstrează faptul că la 37°C
9 gelul devine mai puțin vâscos și, astfel, este favorizată cedarea principiului activ încorporat în
hidrogel. Această comportare reologică permite o etalare corespunzătoare la administrarea
11 cutanată a hidrogelurilor testate.

RO 132539 B1

Revendicări

	1
1. Extract selectiv vegetal, obținut din <i>Morus alba</i> și standardizat în polifenoli totali și flavonoide totale, caracterizat printr-un conținut de polifenoli totali, exprimați în acid galic de 0,60...4,69 g%, și un conținut de flavonoide totale, exprimate în quercetol de 1,18...1,59 g%.	3 5
2. Procedeu de obținere a unui extract selectiv vegetal din <i>Morus alba</i> , caracterizat prin aceea că:	7
- se extrag principiile active prin extracția la reflux de 1-2 ori a produsului vegetal cu etanol 50% în raport de 1:10, timp de 30...60 min, se filtrează la presiune scăzută, se concentrează soluțiile extractive la evaporator rotativ la temperatură scăzută de 50°C, se usucă extractul prin liofilizare;	9 11
- se purifică prin fracționarea extractului total pe coloană deschisă cu fază staționară de silicagel 60 70...230 mesh, 63...200 μm și solvent în gradient treptat de eter etilic:acetat de etil, acetat de etil:metanol și metanol:1% acid acetic în metanol; gradient: 100:0, 25:80, 50:50, 75:25 și 0:100, cu colectarea fracțiunii finale eluate cu solventul metanol:1% acid acetic în proporție de 1:1.	13 15
3. Extract vegetal conform revendicării 1, obținut prin procedeul definit în revendicarea 2, pentru utilizare în terapia antialergică.	17
4. Extract vegetal conform revendicării 1, obținut prin procedeul definit în revendicarea 2, pentru utilizare la formularea unor forme farmaceutice, reprezentate de soluții, loțiuni, creme, unguente, geluri, paste, plasturi transdermici, spume sau aerosoli, forma preferată fiind gel.	19 21

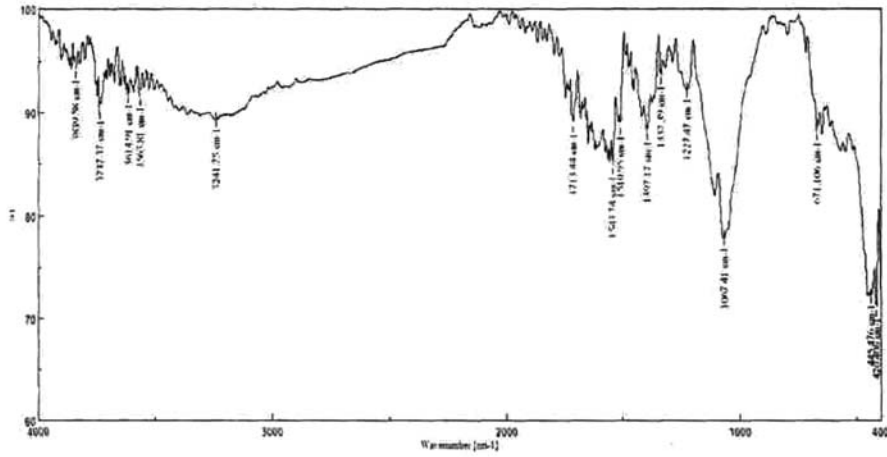


Fig. 1

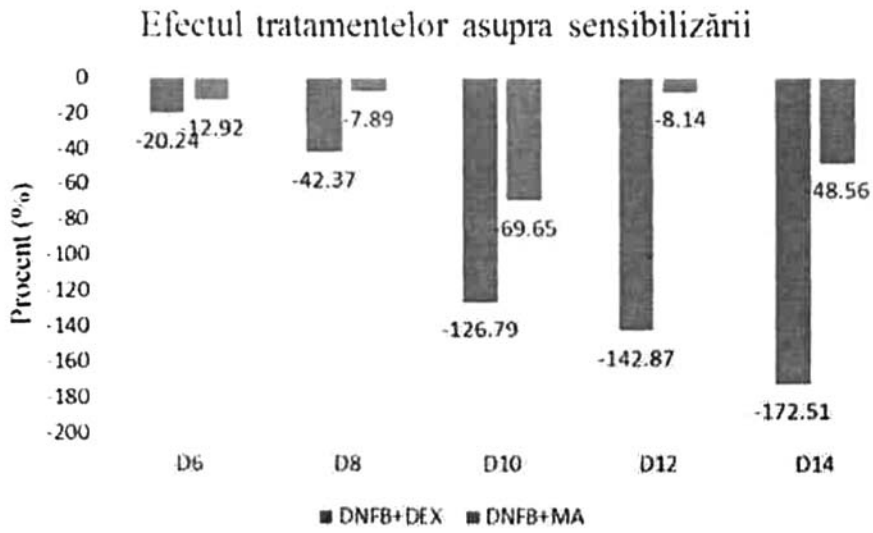


Fig. 2

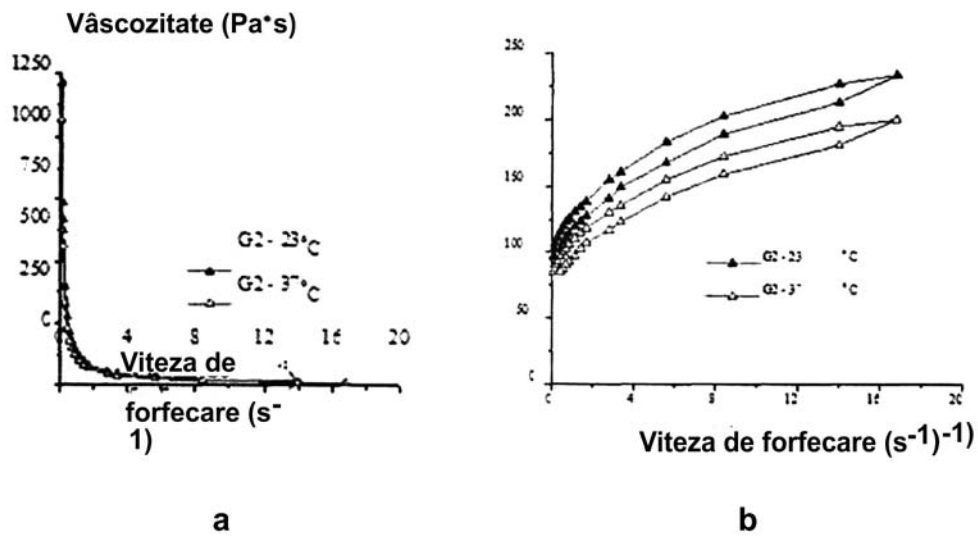


Fig. 3

