



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **23.08.2012**

(41) Data publicării cererii:
30.08.2013 BOPI nr. **8/2013**

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

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

• **ENE MANUELA DIANA**,
STR. CERNIȘOARA NR. 46, BL. P18, SC. 3,
ET. 4, AP. 48, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• **OLARIU LAURA**, BD. ION MIHALACHE
NR. 42-52, BL. 35, SC. B, ET. 10, AP. 79,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **NIȚĂ ROXANA ANDREEA**, STR. PRAVĂȚ
NR. 20, BL. P 9, SC. 7, ET. 4, AP. 140,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **DINCĂ GABRIELA**,
STR. DIMITRIE GROZDEA R. 10, BL. 82,
SC. 1, ET. 1, AP. 6, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PRODUSE FITOTERAPICE CU ACȚIUNE CUMULATĂ ÎN
PERTURBĂRI INFLAMATORII CUTANATE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un produs fitoterapic, utilizat în dermatologie. Produsul conform invenției este constituit în procente masice din 0,1...12% extract de *Herba Trifolii*, eventual, extract de *Hippocastani*, respectiv, 1...2% extract de *folium Hederae*, extract de *radix*

Bardanae, 0,1...2,5% extract de *herba Cyani* și, în rest, agenți de condiționare uzuali.

Revendicări: 9

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

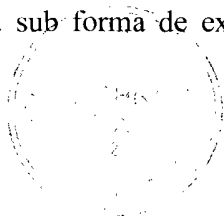


PRODUSE FITOTERAPICE CU ACTIUNE CUMULATA IN PERTURBARI INFLAMATORII CUTANATE

Prezenta inventie se refera la produse fitoterapice cu actiune cumulata de restructurare dermica si antiinflamatoare utilizate in tratarea diferitelor manifestari fiziopatologice ale tesutului cutanat: celulita, edeme periferice, cearcane.

Brevetul de inventie propune asocierea principiilor active izolate din diferite plante, in scopul cumularii actiunilor de **restructurare dermica** prin stimularea turn-overului celular si proteic precum si a adeziunii celula – matrix extracelular, **fotoprotectoare** prin protectie celulara fata de inducerea apoptozei, efect antioxidant, anti-inflamator si anti-angiogenic fata de radiatia UV, **anti-inflamatoare la nivel vascular** prin inhibitia citokinelor pro-inflamatorii IL6 si IL8 si a supraexpresiei moleculelor de adeziune monocit – endoteliu (ICAM si VCAM) si **anti-permeabilizare vasculara** prin inhibitia factorului VEGF, evidentiate prin teste specifice pentru fiecare produs cosmetic activ, si anume:

- extract selectiv denumit **Dermo ET**, izolat din **Herba Trifolii**, conditionat sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat in compusi flavonoidici exprimati in quercetina de min.0,15 g/100 ml si in agliconii izoflavonici de min.0,23 g/100 mL ca suma a daidzeinei, genisteinei, formononetinei si biochaninei A, determinata cantitativ prin HPLC si anume: daidzeina min.10 mg/100 mL, genisteina min.20 mg/100 mL, formononetina min.140 mg/100 mL si biochanina A min.60 mg/100 mL, obtinut in raport 2:1-1:1 planta: extract final;
- extract selectiv denumit **Dermo Cas**, izolat din **Hippocastani semen**, conditionat fie sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat in proantociani de min.0,15 g/100 g si saponine triterpenice totale exprimate in escina de min.2 g/100 g, obtinut in raport 1:1 planta: extract final; sau sub forma de extract uscat sub forma unei pulberi galben-cafenii nehigroscopice, denumit **Dermo Es**, standardizat in saponine triterpenice exprimate in escina de min.70%, si in flavonoide de min 2% obtinut in raport 33:1 planta: extract final;
- extract selectiv denumit **Dermo EH**, izolat din **Folium Hederae Helicis**, conditionat fie sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimati in acid cafeic de min.0,3 g/100g, si in saponine triterpenice totale exprimate in hederacozida C de min.3 g/100 g, obtinut in raport 1:1-1: 2 planta : extract final, sau sub forma de extract uscat sub forma unei pulberi alb-cafenii, nehigroscopice,



L. H. H. H.

Handwritten signatures and initials, including "B. B.", "R. B.", "M. B.", and "A. B."

denumit **Dermo HdC**, standardizat in saponine triterpenice exprimate in hederacozida C de min. 60 %, obtinut in raport 20:1 planta: extract final;

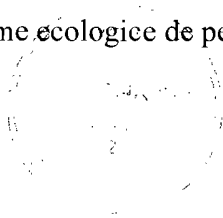
- extract selectiv denumit **Dermo B**, izolat din **Radix Bardanae**, conditionat sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimate in acid cafeic de min. 0,3 g/100 g, , obtinut in raport 1:1 planta: extract final;

- extract selectiv denumit **Dermo Abs**, izolat din **Herba Cyani**, conditionat sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimate in acid cafeic de min.0,9 g/100 g si in compusi flavonoidici exprimate in rutin de min.0,5 g/100 g, obtinut in raport 1:1-1:2 planta: extract final;

Brevetul prezinta efectele biologice complementare si sinergice ale produselor cosmetic active ce evidentiaza proprietatile de restructurare dermica, anti-inflamatoare si anti-edematoase la nivel cutanat, dar si variantele de conditionare ale componentelor active, sub forma de produse cosmetice, dezvoltate pe baza asocierii actiunilor tinta demonstrate la nivel celular.

Conform prezentului brevet, obtinerea culturilor de **Trifolium pratense** utilizate ca materii prime vegetale pentru obtinerea extractului selectiv **Dermo ET** se realizeaza in sistem ecologic. Culturile agricole ecologice reprezinta solutia pentru rezolvarea problemelor legate de satisfacerea cererii tot mai crescute pentru produsele naturale ecologice, ce nu presupun folosirea substantelor chimice de sinteza. Lipsa pesticidelor remanente in planta utilizata ca sursa de materii prime este un deziderat al industriei farmaceutice si cosmetice moderna, in special datorita utilizarilor terapeutice ale fitocompusilor. In tehnologia de cultivare ecologica a trifoiului rosu, metodele de pregatire a terenului, de infiintare si intretinere, de combatere a bolilor si daunatorilor, precum si recoltarea s-au realizat in conformitate cu principiile de agricultura ecologica, avand caracter de noutate pentru tara noastra. Un alt aspect inovativ il constituie folosirea in cultura ecologica a **varietatii Pratorum**, cultivata fara planta protectoare la distanta intre randuri de 25cm.

In cazul surselor de materii prime vegetale - **Hippocastani semen si Folium Hederae Helicis**, acestea provin din arii protejate ecologic, iar **Herba Cyani si Radix Bardanae** se obtin din loturi de testare experimentală in vederea omologării unor tehnologii de cultura ecologica. Caracterul de noutate il reprezinta introducerea in cultura (lotul de testare) a celor doua specii de plante (albastrele si brusture) si obtinerea pentru prima data la noi in tara de materii prime ecologice de pe suprafete cultivate ecologic, nu din flora spontana.



Handwritten signature

Handwritten signatures and initials

Tehnologiile de obtinere a extractelor selective implicate in realizarea inventiei presupun consumuri energetice minime si randamente optime, nu maxime, utilizand pe cat posibil drept mijloace de extractie substante de origine naturala: apa, alcool etilic, glicerina, uleiuri vegetale.

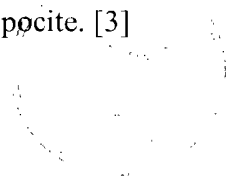
Tehnologia la nivel industrial de obtinere a componentelor terapeutic si/sau cosmetic active, propusa conform inventiei presupune cateva avantaje:

- instalatia de extractie este simpla dar foarte eficienta fiind alcatuita din vase de extractie si rezervoare din inox - pentru solvent si solutiile extractive- intre care s-a montat o bucla de recirculare a solventului/miscelei in care sunt amplasate 2-3 pompe centrifuge a caror viteza de 2900 rpm imprima o capacitate mare de extractie a componentelor din planta;
- extractia componentelor utilizeaza pe cat este posibil drept mijloace de extractie substante de origine naturala: apa, alcool etilic, glicerina, conform principiilor tehnologiilor ecologice ;
- fiind tehnologii ecologice, evita temperaturile de prelucrare mari, ceea ce presupune consumuri energetice reduse ;
- etapele de extractie se realizeaza la temperatura ambianta ;
- intregul proces evita valorile de pH extreme realizandu-se de obicei la valorile obisnuite ale solventilor;
- timpul de extractie este mult redus datorita vitezei mari de recirculare a solventului/miscelei;
- etapele de concentrare se realizeaza sub vid, marind astfel capacitatea de distilare si reducand timpul operatiilor;
- componentele active obtinute ce reprezinta ingredientii cosmetici, sunt conditionate in diferite produse cosmetice de ingrijire a pielii de tip **anticelulitic, anti-cearcane, anti-edematos**; eficacitatea acestora se bazeaza pe actiunea cumulata, sinergica demonstrata prin teste la nivel de celula tinta, confirmate si pe studii clinice pe voluntari umani.

Majoritatea proceselor patofiziologice din organism reprezinta un cumul de factori declansatori si procese biologice complexe care stau la baza instalarii acestora.

Astfel, **celulita** este o afectiune dermatocosmetica cu un grad mare de complexitate, implicand procese inflamatorii in sistemul circulator si limfatic, modificari structurale ale matrixul extracelular, exces de tesut adipos subcutanat datorat perturbarilor metabolismului lipidic (cresterea lipogenezei si incetinirea lipolizei). [1-2].

Prin urmare, in tratamentul eficient al acestei afectiuni trebuie intervenit atat prin reducerea adipogenezei cat si prin stoparea inflamatiei vasculare si restructurarea dermului afectat de insertiile de adipocite. [3]



E. Zilber

BRB
AR

St
Sey, Nuri

Un alt proces inflamator aflat la granita intre terapie si realizarea unui confort personal prin produsele de ingrijire dermato-cosmetice il reprezinta senzatiile de „piciorare obosite” sau „grele”, unul dintre primele simptome ale bolilor periferice vasculare. [4]

Dintre acestea, insuficienta cronica venoasa afecteaza aproape 40% din populatia tarilor dezvoltate. In progresia acestei patologii exista o crestere a fluxului microcirculator sanguin care cauzeaza dilatarea capilarelor, inducand hipertensiune venoasa, dar si tulburari de permeabilitate vasculara, propagarea inflamatiei prin cascada de citokine extracelulare, stimularea moleculelor de adeziune, dar si modificari la nivel dermic legate de matricea extracelulara cu rol suport pentru microvasculatura. [5,6]

Astfel, calea optima de interventie este actiunea concertata atat la nivel de vas sanguin, proces inflamator endotelial si restructurare dermica prin inhibitie de matrix metaloproteinaze (ex. MMP 9 este implicata in remodelarea tisulara venoasa) si accelerarea biosintezei proteice.

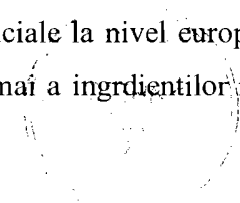
Cearcanele sau hiperchromia periorbitala reprezinta o alta manifestare fizio-patologica de tip inflamator, cauzata in principal de melanizarea dermica si/sau congestia hemodinamica post inflamatorie.[7]

Cu toate acestea, studii histologice au evidentiat o slaba corelare intre ameliorarea cearcanelor si reducerea melanozei, ceea ce sugereaza o cale de interventie terapeutica diferita de cea a modularii cantitatii de melanina. Exista factori de mediu si congenitali care converg la aparitia cearcanelor, printre care: radiatia UV, imbatranirea cronologica, stressul psihic si emotional, reactii alergice si atopice, chiar si dezechilibrul estrogenic, toate acestea fiind convergente catre eliberarea de mediatori ai inflamatiei (citokine, factori proteici de semnalizare) ce afecteaza permeabilitatea vasculara. [8,9]

Agentii anti-inflamatori frecvent utilizati in produsele dermatologice, sunt compusii steroidici de tipul corticosteroizilor cum sunt: dexametazona, hidrocortizonul, triamicinolona singuri sau asociati, dar datorita efectelor sistemice adverse ce le provoaca, sunt din ce in ce mai evitati. De asemenea, utili pentru efectul anti-inflamator sunt compusii ce includ substantele nesteroidiene de tipul: piroxicam, tenoxicam, diclofenac, indometacin, fenamat, ibuprofen, naproxen, ketoprofen, fenilbutazona, toti compusi obtinuti prin sinteza chimica.

Tendinta actuala o reprezinta inlocuirea agentilor terapeutici de sinteza cu cei naturali, obtinuti din lumea vegetala, a microorganismelor sau animala, care, desi au de obicei o activitate farmacologica mai scazuta, sunt mai eficienti la utilizarea pe termen lung, datorita sigurantei la administrare fiind de obicei lipsiti de reactii adverse majore.

Documentele oficiale la nivel european din ultimul timp [10] impun noi reglementari legate de utilizarea numai a ingredientilor naturali, obtinuti prin metode/procedee simple ecologice,



Eflin
BB
SZC
2/2

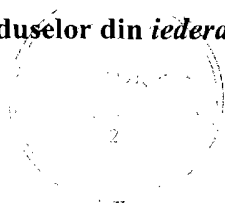
fiind interzisa folosirea substantelor de aromatizare colorare sau cu efect antioxidant, obtinute prin sinteza chimica.

Astfel in ultima decada au aparut brevete ce revendica utilizarea de preparate de origine vegetala cu efecte terapeutice diverse: anti-inflamatoare, antioxidante, pentru cresterea permeabilitatii vasculare, lipolipemiante e.t.c. Astfel:

- Brevetul de inventie US 7,098,189/29.08.2006 utilizeaza drept anti-inflamatori naturali diferite extracte obtinute din: ceara de Candelilla, bisabolol, extract de Aloe vera, diversi steroli din plante, extracte din Rubia, Commiphora, kola, musetel, trifoi, Glycyrrhiza, acid glicirinic, dar si derivatii acestuia sub forma de saruri sau esteri. Nu sunt specificate concentratiile componentelor active ci doar proportia in lor in produsele cosmetice finale.
- Cererea de brevet de inventie WO 1984/002846 propune un unguent pe baza de: enzime- papaina, bromelaina, tripsina, chimotripsin, pancreatina, lipaza, amilaza-, un extract de aloe si un agent astringent pentru tratarea pielii ranite.
- Brevetul de inventie EP 1932517/18.06.2008 pentru tratarea cancerului si a sindroamelor autoimune inflamatoare propune o compozitie lipozomala ce contine derivati de polifenoli- in principal acid cafeic-, acid ferulic, luteolina, diosmina, hesperetina, naringenina, quercetina, catehine, resveratrol. Nu sunt specificate sursele acestor compusi decat in cazul acidului cafeic.

Pornind de la ideea ca agentii anti-celulitici utilizati in mod obisnuit sunt compusii xantinici-cafeina, teofilina, teobromina si aminofilina [11], inventia de fata propune asocieri intre unul dintre acestia, cafeina, cunoscut ca agent de accelerare a lipolizei tesutului adipos si principiile bioactive obtinute- prin tehnologii proprii- din urmatoarele specii de plante: **Herba Trifolii, Hippocastani semen, Folium Hederæ Helicis**, cu efecte anti-inflamatoare si dermo-restitutive. Conform inventiei, principiile active existente in preparatele fitoterapice si care sunt responsabile de efectul cumulat, sinergic, apartin saponinelor triterpenice - escina si hederacozida C, polifenolilor - acid cafeic, flavonoidelor, proantocianilor, izoflavonelor si poliacetilenelor.

Pentru **primele stadii de evolutie ale edemelor vasculare periferice**, actiunea concertata la nivel de vas sanguin si tesut cutanat se refera la restructurarea dermica prin inhibitie de matrix metaloproteinaze si accelerarea biosintezei proteice, asociata cu stoparea procesului inflamator vascular in ansamblul sau, inclusiv a permeabilizarii vasculare prin inhibitia VEGF. Acesta tinta terapeutica este atinsa, conform prezentei inventii, prin **asocierea bioproduselor din iedera, trifoi rosu si brusture.**



Handwritten signatures and initials, including the name 'L. G. G. G.' and other illegible marks.

De asemenea, bazandu-ne pe **mecanismele de aparitie a hiperchromiei orbitale**, a fost conceput un produs de combatere a acestei afectiuni prin asocierea unor componente bioactive din urmatoarele specii de plante: *Centaurea cyanus*, *Trifolium pratense*, *Aesculus hippocastanum*.

Extractul de trifoi- Dermo-ET, prin actiunea complementara a principiilor active componente (izoflavone: genisteina, daidzeina, biochanina, formononetin, si flavonoide de tip quercetina, ce justifica efectul antioxidant evidentiat) are **efect restructurant dermic prin 2 mecanisme: stimularea sintezei de colagen si inhibitia MMP9** (reconsolidarea matricei extracelulare cu rol suport) si *accelerarea proliferarii celulare a fibroblastilor*, induce *supraexpresia integrinelor responsabile de adeziunea inter celulara* si prin urmare de fermitatea tesutului cutanat, cumulat cu efectul antioxidant si fotoprotector fata de radiatia UV-A si UV-B, inclusiv de stopare a angiogenezei. Acesta este componenta responsabila de restructurarea dermica, asigurand integritatea suportului structural al retelei sanguine, necesara in combaterea tuturor celor 3 tipuri de perturbari inflamatorii cutanate ce fac obiectul prezentului brevet .

Extractul uscat din seminte de castan salbatic cu un continut de min.70% saponine triterpenice exprimate in escina, precum si extractul din frunze de iedera cu un continut de min.60% in saponine triterpenice exprimate in hederacozida C, prezinta efect anti-inflamator vascular cumulat, *inhiband expresia* moleculelor de adeziune ICAM si VCAM si *secretia de citokine pro-inflamatorii IL6 si IL8 si de asemenea reduce permeabilitatea vasculara (scade eliberarea factorului VEGF), in sensul reducerii edemelor*. Asocierea celor doua extracte cu actiune anti-inflamatoare se justifica prin efectele complementare ale acestora, dupa cum urmeaza: **extractul uscat din seminte de castan salbatic** inhiba angiogeneza produsa de radiatia UV - stopeaza vascularizarea superficiala a pielii, iar **extractul din frunze de iedera** reduce edemele prin scaderea permeabilitatii vasculare.

Extractul uscat de iedera-Dermo EH inhiba expresia moleculelor de adeziune ICAM si VCAM si secretia de citokine pro-inflamatorii IL6 si IL8 si reduce permeabilitatea vasculara(scade eliberarea VEGF), in sensul diminuarii edemelor. Actiunea sa anti-inflamatoare este accentuata de cea a **extractului de brusture- Dermo B** care pe langa stoparea inflamatiei vasculare are si efect antioxidant si antimicrobian.

Extractul de albastrele- Dermo Abs, ca si cel de castan Dermo Cas- prezinta actiune anti-inflamatoare la nivel de endoteliu vascular (inhibitia expresiei moleculei de adeziune ICAM, si a eliberarii citokinelor pro-inflamatorii IL6 si IL8), prin combinarea celor 2 extracte obtinandu-se un efect potentat. In plus, componentele **extractului de albastrele** confera

Exhibe - Buz
Si
11/12
S. Alu

acestui si un **efect antioxidant si antimicrobian**, precum si **anti-iritant fata de radiatia UV** (inhiba IL1 α -molecula semnal pro-iritativa), aspecte importante in formulari destinate zonelor anatomice cu sensibilitate crescuta, foto-expuse. Complementaritatea actiunii extractului de castan cu cel de albastrele se manifesta si prin efectul de stopare a angiogenezei generate de radiatia UV, acest cumul de efecte conferind eficacitate maxima in protectia solara.

Pe plan mondial se efectuează intense cercetări fitochimice și farmacologice în scopul obținerii unor substanțe și produse bioactive vegetale cu activitate terapeutică care să fie lipsite de efecte adverse și care să poată fi utilizate în produse dermatocosmetice sau cosmetice.

Flavonele si izoflavonele

Izoflavonele, substante ce apartin clasei polifenolilor, pot fi obtinute prin sinteza sau din surse vegetale, din plante ce apartin fam.Leguminoaselor. Rolul izoflavonelor in plante se pare ca este de hormoni, dar prezinta si proprietati antioxidante si antibacteriene.Cele mai studiate izoflavone sunt genisteina si daidzeina izolate din soia.

Exista studii ce demonstreaza proprietatile estrogenice moderate ale izoflavonelor genisteina si daidzeina, administrate sub forma de suplimente nutritive, dar doza zilnica limitativa-datorita insuficientei datelor de siguranta la administrare-de 80 mg/zi se pare ca este prea joasa pentru a se evidentia eficacitatea.

Dupa ingestia genisteinei sub forma de suplimente [12], s-a determinat scaderea masei corporale si a grasimii din tesuturi, acompaniate de scaderea apetitului;de asemena s-au inregistrat si alteratii ale concentratiilor hormonilor: insulina, tiroida, adenocorticotrop, cortizol si corticosteron. In plus, continutul de genisteina este asociat cu alterarea expresiei genelor angajate in metabolismul lipidic, iar transportul glucozei este deficitar, in celulele afectate de lipoliza, lipogeneza , alterand si sinteza de ATP.

Izoflavonele –inclusiv genisteina-din soia [13] prezinta efecte antioxidante si protejeaza celulele fata de radicalii liberi-inhiband expresia raspunsului la stres, a genelor implicate , in acest mod reducand carcinogeneza.

In terapia PUVA , genisteina protejeaza pielea de efectul psoralenilor si a radiatiilor UV, ce este asociata cu cresterea riscului aparitiei carcinoamelor si a melanoamelor.[14]

Miyazaki K si colab.[15] au studiat efectul daidzeinei si genisteinei asupra acidului hialuronic pe culturi celulare de keratinocite umane si pe pielea soarecilor epilati prin aplicatii topice timp de 2 saptamani. Rezultatul a evidentiat o crestere semnificativa a productiei de acid hialuronic atat in experimentul in vitro cat si in vivo. Se sugereaza astfel ca atat genisteina cat

Stefan

Bob

SB
M
W

si daidzeina prin aplicatii topice previn si imbunatatesc alterarile cutanate cauzate de pierderea de acid hialuronic de la nivelul pielii.

Beneficiile ce pot deriva prin aplicarea topica a compozitiilor cosmetice se pare ca sunt superioare celor ce se pot obtine prin ingestia sistemica a acestor substante active, din urmatoarele motive:

- biodisponibilitatea izoflavonelor la nivelul pielii se pare ca este mai mare decat via absorbtie gastrointestinala pentru ca astfel se evita posibilitatea degradarii lor la nivelul intestinului in componente inactivate;
- in plus, concentratia izoflavonelor poate fi mai mare in aplicatii topice in situatia in care pentru anumite efecte (antioxidante, diferentiere celulara) este indoielnica administrarea orala;
- de asemenea tratamentul poate fi localizat pentru aplicatii topice in diferite boli dermatologice cum sunt psoriasis, eczeme, iar prezenta in amestec, alaturi de izoflavone si a altor componente naturale cum sunt fosfolipidele, polifenolii, sitosterolii si saponinele reprezinta un beneficiu pentru piele.

Datorita absentei unor efecte secundare nedorite, izoflavonele ar putea fi utilizate in aplicatii topice pentru prevenirea imbatranirii pielii, aparitiei celulitei.

Zerykier, in brevetul de inventie DE10329004 13.01./2005, a evidentiat efectul pozitiv asupra cresterii cantitatii de colagen a izoflavonelor, datorita similaritatii structurii sterice- cu doua inele fenolice a acestora- cu structura inelului steroidic a estrogenilor (estradiol, estrona, estriol). Astfel, avand o afinitate substantial mai scazuta decat a estrogenilor, genisteina, daidzeina si formononetina prezinta o usoara actiune estrogenica, fara a provoca efectele sistemice sau secundare negative ale acestora. Genisteina ofera protectie fata de radiatiile UV ce determina aparitia ridurilor, iar daidzeina prezinta un efect citokinic energizand cresterea celulara ce este protejata si controlata de genisteina.

- Cererea de brevet de inventie WO 200503015.7 (A1), propune o serie de produse cosmetice pe baza de izoflavone si bichochalcone pentru indepartarea sebumului de pe piele, tratarea comedoamelor, profilaxia acneei si controlul seboreei. Izoflavonele utilizate pot fi : genisteina si daidzeina din soia si trifoi, prunetina, biochanina A din trifoi si naut si pratenseina din trifoi. Concentratia utilizata este cuprinsa intre 0,05-0,5%.

- Cererea de brevet de inventie US 2006002885 (A1) propune o compozitie pentru tratamentul si profilaxia celulitei, protectia pielii sensibile, imbatranite, pentru cresterea fermitatii si reconstituirea functiei naturale a pielii de bariera fata de influentele mediului extern, a caror ingrediente active o reprezinta unul sau mai multe bioquinone si una sau mai

R. Glimker

mirza
12
SW

izoflavone din grupul: daidzeina, genisteina, genistina prunicina biochanina A, probol, santal, pratenseina; preferata este genisteina, utilizand un preparat Glycine soya ce contine izoflavone, in proportie 0,05-2% si saponine din soia cu o concentratie de 5-20%. In produsul finit, concentratia saponinelor este cuprinsa intre 0,001-2%, a izoflavonelor 0,001-10%; raportul izoflavone:biochinone este cuprins intre 50:1-1:50. Printre izoflavonele utilizate nu se afla formononetina.

- Brevetul de inventie FR 2740681/09.05.1997 propune o compozitie cosmetica cu actiune anticelulitica ce contine: cafeina si un extract din coaja sau frunzele plantei Viburnum; ca si componente active se mentioneaza amento-flavonele si unitati de apigenina, dar nu se evidentiaza prin teste faptul ca biflavonoidele sunt responsabile de acest efect.

- Brevetul de inventie FR 2848853 (A1)/25.06.2004 revendica o compozitie farmaceutica, dietetica pentru tratarea sindromului post menopauza ce consta dintr-un amestec de izoflavone din soia, saponine din soia si vitamina K. Extractul titrat de soia contine 26% saponine si 15% izoflavone.

- Cererea de brevet de inventie US 2005037099 (A1), propune obtinerea prin hidroliza si purificare a unei compozitii din soia, trifoi, kudzu si combinatii ale acestora, pentru tratarea pielii ridate, depigmentate, cu acnee, celulita, sensibila, psoriazis, eczeme. Compozitia din soia poate fi imbogatita cu sitosteroli, saponine, fosfolipide, coumestrioli. Compozitia contine izoflavonele genisteina si daidzeina. Nu se dau informatii despre concentratia /caracterizarea chimica a produsului obtinut prin hidroliza si purificare si nici randamente de obtinere.

- Brevetul de inventie WO 9918927 (A1)/22.04.1999 revendica o compozitie cosmetica ce utilizeaza un extract de trifoi, obtinut prin extractia cu alcool etilic in raport 15:85, conditionat in butilenglicol. In produsul finit, extractul se poate afla in concentratia cuprinsa intre 0,01%-50%; nu se dau date referitoare la compozitia chimica a extractului, randamentele de obtinere. Se mentioneaza ca analiza HPLC releva prezenta moleculelor ce apartin izoflavonelor, cum ar fi: genisteina, daidzeina, biochanina, pratenseina si coumestrol.

- Cererea de brevet de inventie MX 201106224 (A)- breveteaza o compozitie ce contine izoflavone pentru tratarea simptomelor legate de menopauza, obezitate, celulita, stres, insomnie, alcatuita dintr-unul sau mai multe izoflavone, un probiotic si un extract de plante. Izoflavonele se pot gasi in proportia 0,01-99,98%, si pot fi selectate dintre: puerarina, daidzina, daidzeina, genistina, genisteina si amestecul lor, obtinute din plantele: Pueraria, Soia, Trifolium. Compozitia se prezinta sub forma lichida sau solida. Nu se dau date referitoare la compozitia preparatelor de izoflavone, nu sunt mentionate biochanina A si formononetina.

E. Glinke

B. Glinke

11/11/12
Sey
Sey

- Cererea de brevet de inventie US 2002106388 (A1) - propune o formula cosmetica pentru tratamentul celulei ce contine flavone si izoflavone. Tratamentul este directionat spre controlul colagenului si reducerea masei grasimii. Izoflavonele utilizate sunt genisteina si daidzeina, furnizate de Merk, de puritate min. 99,5%, adaugate in proportie de 0,1-0,2% , alaturi de hidroxiflavon-quercetina, un xantin derivat-teofilina, carnitina si un extract din planta Coleus.

- Cererea de brevet de inventie KR 20020063479 (A) - revendica o compozitie cosmetica si farmaceutica ce contine izoflavone-genisteina, in doza de 1,5-120 mg/zi ca substanta activa, cu efect in tratarea eczemelor si a dermatitei seboreice. In plus, fata de izoflavone, compozitia mai contine proantocianidine, glucani, squalene si un extract de ceai.

- Brevetul de inventie WO 0164177 (A1)/07.09.2001 propune pentru tratamentul celulei un amestec de flavone si izoflavone libere sau glicozidate-obtinate din proteinele din soia, pleecand de la niste preparate comerciale, sau utilizand diverse plante, cum ar fi trifoiul rosu, linte, mazarea, prin extractia cu unul dintre solventi: etanol, izopropanol, etilenglicol, propilenglicol, butilenglicol, sau in amestec cu apa. Conform inventiei respective, preparatul farmaceutic si cosmetic contine un total de flavone cuprins intre 0,1-20%, iar izoflavonele sau glicozidele acestora un procent de 0,0001-3% de preferat 0,005-0,5%, in produsele finale; printre izoflavonele revendicate nu se afla biochanina si nu se specifica o concentratie a preparatelor de izoflavone si flavone utilizate ci doar proportia acestora in priodusul finit.

Proantocianii si proantocianidinele sunt compusi flavonoidici incolori care formeaza cu acizii minerali antocianidine. Primele proantocianidine au fost extrase din struguri negri necopti, struguri albi copti si din frunzele tinere de Vitis vinifera. Ca structura chimica sunt produsi hidroxilati sau nchidroxilati ce deriva de la flavan 3-4- dioli.

- Brevetul de inventie EP 2 165 712 A1/24.03.2010 propune utilizarea unui produs caracterizat printr-un continut de minim 50 mg/g compusi fenolici-procianidine, propelargoidine, prodelfinidine in cosmetica ca intermediar sau aditiv pentru capacitatea antioxidanta, sau in compozitii farmaceutice pentru actiunea antiglicemica in tratarea diabetului, in infectii urinare pentru capacitatea antimicrobiana.

S-a stabilit ca proantocianii au actiune anti-radicali liberi de 20 ori mai activa decat vitamina E si de 50 de ori mai mare decat vitamina C. Proantocianii actioneaza sinergic cu vitamina C imbunatatind absorbtia acesteia. Astfel, proantocianidinele pot fi utilizate in cosmetica, pentru efectele de protejare a capilarelor [16], protectia pielii si ca inhibitori de elastaza [17]. De asemenea, proantocianii prezinta o incredibila abilitate de a mentine structura colagenului.

Aceasta se realizeaza prin doua mecanisme: unul prin care protejeaza antitripsina-1 substanta-

L. T. G. L. M.

M. I. G. L. M.

ce actioneaza asupra enzimelor ce determina scaderea colagenului, elastinei si acidului hialuronic, deci actiune directa. Al doilea mecanism presupune neutralizarea peroxidarii lipidice a membranelor celulare prin radicalii liberi.

Actiunile specifice ale proantocianidinei A₂ separate din semintele de castan salbatic au fost puse in evidenta de testele farmacologice. S-a constatat ca proantocianidina A₂ nu prezinta toxicitate acuta semnificativa la administrarea p.o. si i.p.. De asemenea prezinta o actiune cicatrizanta semnificativa comparativ cu fractiunea triterpenica obtinuta din *Centella asiatica* - un binecunoscut cicatrizant utilizat in tarile europene. S-a remarcat o activitate vasoprotectoare si antiulceroasa care se pare ca este o consecinta a activitatii protectoare la nivelul microcirculatiei. Testele efectuate atat "in vitro" cit si "in vivo" au pus in evidenta o actiune anti-lipidperoxidanta inhibind formarea malondialdehidei (MDA). Proantocianidina A₂ se poate utiliza in diverse formule farmaceutice: capsule, tablete, drajeuri, solutii sau suspensii pentru administrarea orala, forme injectabile, supozitoare, unguente, emulsii. [18]

Un studiu preliminar [19] realizat cu proantocianidine extrase din semintele de struguri, in doza de 150 mg/zi a determinat cresterea rezistentei capilarelor la subiecti cu hipertensiune si diabet. In experimentul dublu orb cu o combinatie de doua flavonoide: diosmina si hesperidina, in sase saptamani s-au redus simptomele fragilitatii capilare. Utilizarea vitaminei C impreuna cu flavonoidele este recomandata pentru fragilitate capilara.

Saponinele triterpenice

Din punct de vedere fitochimic, printre compuşii bioactivi de origine vegetală cei mai studiaţi se afla clasa triterpenoidelor oxigenate pentaciclice cu structură chimică tip ursan şi oleanan, în stare liberă sau glicozidată, sub formă de complex de saponine triterpenice, denumite după numele agliconului triterpenic sau al plantei din care provin:- oleanozide – aglicon acid oleanolic din *Calendula off* ;- aralozide – aglicon acid oleanolic din *Aralia species*; ginsenzozide – aglicon acid oleanolic + protopanaxadiol + protopanaxatriol din *Panax ginseng.*; hederasaponine-aglicon acid oleanolic si hederagenina din *Hedera sp.*; saponine triterpenice-escina in *Hippocastani semen*;

Exista numeroase studii care evidentiaza efectele biologice ale saponinelor asupra organismelor superioare. Astfel, saponinele maresc permeabilitatea membranelor celulare, formand pori [20].Actiunea hemolitica a saponinelor se pare ca este rezultatul afinitatii agliconului pentru sterolii membranari, in principal colesterol, cu care formeaza complexe insolubile. Cantitatea de glicozide necesara pentru permeabilizare este mult mai mica pentru straturile lipidice bogate in colesterol decat pentru cele fara colesterol membranar.[21].Exista studii care arata ca interactiunea dintre saponine si membrane este mult mai complexa,

E. Glinbu

Bar
W. Jay

interacțiunea fiind independentă de prezența colesterolului. În general, săponinele au fost studiate pentru beneficiile legate de scăderea colesterolului, stimularea imunității și inhibarea celulelor canceroase. Studiile realizate au evidențiat blocarea colesterolului în intestin, atât a celui alimentar cât și a celui produs în ficat și eliminarea acestuia fără a fi resorbit.

Compania cosmetică Indena a realizat un studiu de activitate și eficacitate cu săponine izolate din semințe de castan sălbatic. Fiind surfactanți foarte buni, săponinele din castan se recomandă ca agenți cosmetici delicat pentru spumare, putând fi utilizați pentru a reduce agenții chimici agresivi și iritanți pentru piele.

Experimente de eficacitate al tratamentului insuficienței venoase cu diferite săponine și sapogenine separate din *Hippocastani* semen și *Hedera helix* au fost realizate *in vitro* prin inhibiția enzimelor specifice. [22] Astfel, doar sapogeninele din *Hedera helix*- hederagenina și acidul oleanolic- au prezentat valori comparabile a inhibiției non-competitive a hialuronidazei, dependentă de concentrație. Același comportament l-au avut și față de elastază. Constituienții din *Aesculus hippocastani* au inhibat doar hialuronidaza, cel mai important efect avându-l săponina escina. Genina escinolul a fost mai puțin activ.

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

Extracțele hidroalcoolice din *Hedera helix* constituie componenta de bază a numeroase produse farmaceutice antitusive prevăzute în nomenclatoarele de medicamente din țările europene, [23] iar extracțele glicolice sunt utilizate la obținerea unor produse dermatocosmetice anticelulitice și antilipemice.

- Brevetul de invenție GB 1106133/13.03.1968 prezintă obținerea unor extracțe din *Hedera helix* : săponina, sapogenina și sarea de magneziu a sapogeninei ce sunt inhibitori ai diviziunii și creșterii celulare neavând efect mitoclastic.

- Brevetul de invenție GB 2051575/08.01.1980 prezintă obținerea unor compoziții farmaceutice pe bază de extracțe de iederă (*Hedera helix*) care conțin: Hederasaponina C (Hederacozida C) 60...90% sau α -hederină, cu posibilitatea utilizării formă de tablete, soluție injectabilă, unguent, ca medicamente cu activitate antifungică și antiparazită, în terapia umană și veterinară.

- Brevetul de invenție US 20060057236/16.03.2006/ A1 prezintă un procedeu de obținere a unui extract din frunze de *Hedera helix*, care conține α -hederină în proporție de 4,7%, și poate fi condiționat sub formă de produse farmaceutice de uz intern și extern, aplicabile în tratamentul tulburărilor respiratorii, datorită efectelor bronhospasmodice ale α -hederinei.

LT J. J. J.

Handwritten signatures and initials.

- Brevetul de invenție CN 1245693/01.03.2000 prezintă o pulbere medicamentoasă destinată tratamentului diferitelor forme de leucemie, care conține ca material principal pulberea de iederă, alături de alte produse vegetale pulverizate, efectul terapeutic având o rată de vindecare de 96%, fără efecte adverse toxice.

- Brevetul de invenție RU 2127605/20.03.1999 prezintă o metodă de stimulare a imunității celulare utilizând ca produs bioactiv adjuvant glicozidele triterpenice izolate din diferite organe ale plantelor din genul *Hedera*, metoda fiind aplicabilă la prepararea vaccinurilor.

Poliacetilenele

Brusturele este utilizat în mod tradițional pentru uz topic pentru eczeme, psoriazis, alopecie, acnee, furuncule, abcese, infecții locale ale pielii dar încă nu s-au adunat destule date științifice care să dovedească aceste efecte prin mecanismele de acțiune.

Radacinile de brusture conțin aproximativ 27-45% inulina, mucilagi, 0,06-0,18 uleiuri esențiale, poliacetilene antibacteriene cu sulf și alifatic, substanțe amare, polifenoli: acid cafeic, clorogenic; acizi volatili. Eficacitatea terapeutică în practica fitoterapeutică a fost pusă până acum pe seama mucilagiilor și a inulinei.

Activitatea desmutagenică a brusturei a fost evidențiată prin studii in vitro față de diverși agenți mutageni - 4-NO₂-1, 2-DAB, ethidium bromide și a fost atribuită arctigeninei. [24]. De asemenea există studii care sugerează faptul că sucul proaspăt de brusture inhibă dezvoltarea modificărilor cromozomiale anormale induse de DMBA. [25, 26]. Administrarea subcutanată a unui extract brut de radacina de brusture, în model experimental a determinat scăderea edemului indus, precum și activitate anti-radicali liberi. [27]. Studii preliminare in vivo de evaluare a activității poliacetilenelor cum sunt falcarinolul, dehidrofalcarinol și dehidrofalcaridinol pe melanom de soarece, au demonstrat potențialul antitumoral al acestor compuși, ultimul fiind cel mai activ.

Există studii care au evidențiat activitatea antibacteriană a radacinilor de brusture care a fost atribuită prezentei poliacetilenelor față de bacteriile gram negative inclusiv *E. coli*, *Shigella flexneri*, și *Shigella sonnei* [28]. Acetilenele alifatic izolate din radacinile de brusture sunt biosintetizate pornind de la acizii C₁₈- acetilenici prin două β-oxidări legate de precursorii C₁₄- acetilenici.

Acetilenele formează un grup distinct de produși naturali cu reactivitate chimică relativă, care au fost găsiți în aproximativ 24 de familii de plante superioare. Majoritatea acetilenelor din plantele alimentare sunt de tip alifatic – falcarinol și fac parte din familia Apiaceae și Araliaceae.

L. Ghimbu

11/08/2012
B. S. S. S.
M. S.

Actiunea antifungica a falcarinolului si falcarindiolului a fost evidentiata pe spori de Botrytis cinerea si Mycoentrospora acerina ce se acumuleaza in radacinile de morcovi cand acestia sunt depozitati.[Harding;Hale 1980].Plantele din familia Solanaceae nu produc in mod normal acetilene, cand sunt proaspete si sanatoase, dar cand sunt infectate cu mucegaiuri de tipul Cladosporium fulvum ele acumuleaza fitoalexine acetilenice de tip falcarinol.[De Wit; Kodde 1981].Proprietatile antimicrobiene ale acestor compusi au fost explorate si fata de bacterii de tipul Staphylococcus aureus si Bacillus subtilis.

De asemenea, falcarinolul si falcarindiolul prezinta si actiune antiinflamatoare si anti-agregant plachetara. [Teng;1999; Appendino 1993; Alanko 1994]. Pentru falcarinol s-a sugerat ca actiunea farmacologica este legata de abilitatea compusului de a modula catabolismul prostaglandinelor prin inhibitia enzimei 15-OH-prostaglandin dehidrogenaza [Fujimoto 1998].

- Brevetul de inventie EA 001339 (B1)/26.02.2001 prezinta un tratament antimicrobian pentru tratarea infectiei cu virusul Herpes Simplex , in compozitia obtinuta din planta Echinaceae intrand mai multi compusi fitochimici : echinacozide, esterii ai acidului cafeic, enzime, acid glucuronic, inulina , poliacetilene;

- Brevetul de inventie HU 212538 (B)/29.07.1996 prezinta un ingredient activ ce contine poliacetilene din plante din familia Compositae, Umbeliferae si Araliaceae , avand actiune acaricida si aficida ;

- Brevetul de inventie JP 3200736 (A)/02.09.1991 propune un compus nou cu structura poliacetilenica , utilizat ca medicament antitumoral, obtinut din speciile de Ginseng.

- Brevetul de inventie JP 3017043 (A)/25.01.1991 revendica utilizarea unui nou compus poliacetilenic obtinut din planta Bluperum falcatum, ca medicament antialergic , antiinflamator de uz oral inhibitor de 5-lipoxigenaza sau cyclooxygenaza.

În continuare sunt prezentate brevetele de invenție și cererile de brevet de invenție care prezintă procedee de obținere a unor produse bioactive aplicabile în terapeutică, pe baza de compuși triterpenici glicozidați , izoflavone, flavone, obținute din plantele **Hedera helix, Hippocastani semen, Trifolium pratense, Arctium lappa, si Centaureae cyani.**

Din analiza datelor de literatura referitoare la procedee de obtinere a extractelor de **Hedera helix** s-au identificat urmatoarele brevete de inventie:

- Brevetul de inventie FR 1.531.621/24.05.1967 "Procedeu de preparare a complexelor triterpenice din plante" prezinta obtinerea din tulpini de Hedera helix a patru complexe de saponine sub forma unor lichide uleioase si a unei pudre galben brun ce au fost caracterizate prin cromatografia pe strat subtire evidentiindu-se prezenta a 2-10 spoturi de saponine in

E. G. M. L.

fiecare proba. Procedul de obtinere prevede extractia materiei prime vegetale cu etanol 60% si prelucrarea extractului total obtinut sub forma de pudra prin extractia succesiva cu etanol 96%, acetona, eter de petrol, metanol, iar etapa de purificare se efectueaza prin adsorbție pe carbune activ in raport 1/4 extract/adsorbant si desorbția ulterioara cu diferiti solventi : metanol, cloroform , acetat de etil , benzen, piridina. Dezavantajul major al brevetului o reprezinta faptul ca produsele obtinute ce sunt complexe de saponine nu sunt caracterizate analitic prin continutul in substanta activa ci doar prin metode de evidentiere a spoturilor prin cromatografia pe strat subtire. Procedul este laborios avand multe etape de extractie si separare, este neeconomic, obtinandu-se randamente mici de extractie chiar si atunci cand se obtin amestecuri de compusi triterpenici (din 100 kg planta intre 4-450 g extracte lichide uleioase), utilizeaza diversi solventi de extractie si purificare usor inflamabili, cancerigeni si neecologic (benzen, piridina, metanol, cloroform).

- Brevetul de inventie GB 1106133/13.03.1968 prezinta obtinerea unor extracte din Heder helix : saponina, sapogenina si sarea de magneziu a sapogeninei, prin extractia cu alcool etilic 70%, precipitarea complexului de saponine cu sulfat de amoniu, purificarea cu alcool etilic 93% si metanol 98%, iar pentru indepartarea pigmentilor, rezinelor si a uleiurilor se utilizeaza acetona, acetatul de etil, metil etil cetona, triclor etilena, cloroform prin dizolvarea extractelor concentrate de sapogenine sub forma de reziduu uscat urmata de filtrare, pentru indepartarea solventilor organici. In acest mod se obtine saponina, sub forma unei pudre amorfe, de culoare alb-crem, usor solubila in apa, metanol, etanol, dar insolubila in acetona si acetat de etil, avand punctul de topire intre 195-200°C., iar sapogenina ca pudra de culoare alba, insolubila in apa la pH acid, solubila in metanol, etanol izopropanol.

- Cererea de brevet de inventie CN 200710034341/29.01.2007 prezinta obtinerea unui preparat de Hederacozida C de puritate 98,2% determinata prin HPLC, prin extractia hidroalcoolica 30-95% la reflux, obtinerea extractului brut , dizolvarea acestuia in apa intr-un generator de ultrasunete si extractia ulterioara cu eter si acetat de etil pentru indepartarea substantelor balast, ce impurifica extractul. Extractul astfel obtinut se extrage cu n-butanol, si se continua purificarea cu etanol 95%, acetat de etil (pentru dizolvarea partii insolubile) metanol, si cromatografie pe colana folosind drept eluant amestec cloroform:metanol 65:35. Procedul este neeconomic, nu se poate aplica la scara industriala utilizand instalatii costisitoare (generator de ultrasunete, coloane cromatografice), amestecuri de solventi greu de recuperat si utilizat iar produsul obtinut se obtine cu randamente extrem de mici pentru aplicatii la nivelul industriei farmaceutice 0,21 g/100 g materie prima vegetala.

L. Gl. m. b.

108
108
108

- Brevetul de invenție GB 2051575/08.01.1980 intitulat. „Compoziții farmaceutice conținând extracte de iederă agățătoare” prezintă obținerea unor compoziții farmaceutice pe bază de extracte de iederă (*Hedera helix*) care conțin: Hederasaponina C (Hederacozida C) 60...90% sau α-hederină. Procesul de obținere a extractelor prevede extracția succesivă a plantei cu acetonă și metanol, urmata de precipitarea hederasaponinei C din soluția metanolică prin tratare cu eter etilic. Rezultă hederasaponina C, cu un conținut de 60%, care se purifică prin cromatografie pe coloană de Al₂O₃ eluată cu metanol, din care se obține hederasaponina C purificată, cu un conținut de 90%. Se prezintă și transformarea hederasaponinei C – 90% în α-hederină, prin alcalinizare cu NaOH sau KOH 2N, rezultând α-hederina purificată.

- Cererea de brevet de invenție US 20060057236/16.03.2006/ A1”Proces pentru producerea unui extract din frunze de iederă”, prezintă un procedeu de obținere a unui extract din frunze de *Hedera helix*, care conține α-hederină, care prevede fermentarea frunzelor de iederă, cu apă la 30⁰C, când hederacozida C este transformată enzimatic în α-hederină care este extrasă din plantă cu amestecuri hidroalcoolice (etanol) obținându-se un extract sicc, sub formă de pulbere. Se menționează că prin transformarea enzimatică totală a hederacozidei C din plantă în α-hederină, extractul sicc obținut conform invenției este îmbogățit în α-hederină de la 0,53% la 4,74% .

- Cererea de brevet de invenție US 20060210660/21.09.2006/ A1 intitulat: „Proces pentru prepararea unui extract din frunze de iederă”, prezintă un procedeu de preparare a unui extract din frunze de iederă, constituit dintr-un amestec de 2 extracte prelucrate separat în vederea îmbogățirii în hederacozidă C și α-hederină. Extractul îmbogățit în α-hederină se obține prin fermentarea enzimatică a frunzelor de iederă cu apă, la 30⁰C, în scopul convertirii hederacozidei C în α-hederină care se extrage cu alcool etilic 30% extractele hidroalcoolice fiind prelucrate ca extract sicc sub formă de pulbere, cu un conținut îmbogățit în α-hederină: minimum 5%, datorită convertirii în totalitate a hederacozidei C existente în plantă. Extractul îmbogățit în hederacozida C se obține prin tratarea plantei cu vapori de apă supraîncălziți la 120⁰C, în vederea inactivării enzimelor care convertesc hederacozida C în α-hederină, după care se efectuează extracția cu alcool etilic 30 %, extractele hidroalcoolice fiind prelucrate ca extract sicc cu un conținut îmbogățit în hederacozida C: minimum 10%. În vederea utilizării în terapeutică se prepară un amestec din cele 2 extracte sus-menționate, obținându-se un extract final special cu un conținut de 5...8% hederacozidă C și 3...5% α-hederină.

Majoritatea brevetelor de invenție referitoare la *Hedera Helix* prezintă utilizarea extractelor glicolice, hidroglicolice, și hidroalcoolice la conditionarea unor produse farmaceutice și

Agimbe

Agimbe
Agimbe
Agimbe

cosmetice sub forma de gel, crema, balsam. cu efecte antiinflamatoare, antipruritice, antiparazitare, antilipemice si anticelulitice, bronhospastice si pentru stimularea imunitatii celulare dar care au unele dezavantaje:

- procedeele sunt laborioase avand multe etape de extractie si separare, utilizeaza diversi solventi de extractie si purificare usor inflamabili, cancerigeni (benzen, piridina, metanol, cloroform), sunt neeconomice obtinandu-se randamente mici de extractie pentru aplicatii la nivelul industriei farmaceutice 0,21 g/100 g materie prima vegetala pentru produse purificate iar pentru amestecuri de compusi triterpenici din 100 kg planta intre 400-450 g extracte lichide uleioase).

-procedeele nu se pot aplica la scara industriala utilizand instalatii costisitoare (generator de ultrasunete, coloane cromatografice, adsorbanti scumpi Al_2O_3), amestecuri de solventi greu de recuperat si utilizat;

- utilizeaza solventi foarte inflamabili și explozivi – eterul etilic – la obținerea hederacozei C 60% prin precipitare din soluția metanolică, rezultând un mediu de precipitare constituit din eter etilic-metanol, dificil de distilat și separat la nivel industrial în vederea recuperării și refolosirii solvenților ;

Hippocastani semen

Din analiza datelor de literatura referitoare la procedee de obtinere a extractelor de **Hippocastani semen** s-au identificat urmatoarele:

Extractul uscat din Hippocastani semen, obtinut conform DAB 10 si PE, se prezinta sub forma unei pudre galben brun, standardizata in escina 20% dar care nu este acceptata pentru uz oral, datorita utilizarii traditionale este recomandata pentru uz extern pentru insuficienta cronica varicoasa, sindrom ce include picioarele umflate si obosite, varici si ulcere varicoase.

In Monografia EMEA/HMPC/225319/2009 exista extractul uscat obtinut din seminte proaspete de castan (40-80% v/v etanol) standardizat astfel incat sa contina 16-28% triterpene glicozidate calculate ca escina. Pentru administrarea cutanata se sugereaza ca extractul sa corespunda la 100-150 mg escina/zi, iar baza de gel/unguent sa se incadreze 0,7-2% escina; Exista un procedeu de izolare la nivel de laborator [29] a doua proantocianidine: **proantocianidina A₂ si B₂ (dimere)** prin extractia scoartei proaspete de castan cu metanol intr-un reactor Waring. Extractul metanolic din care fractia lipidica a fost indepartata prin extractie cu eter de petrol este concentrat la presiune redusa si temperatura sub 30°C. Concentratul rezultat este reluat cu apa si extras cu acetat de etil si concentrat la presiune scazuta. Dupa dizolvare in metanol este supus unei cromatografieri pe coloana de rasina poliamidica (Polyamide Wöelm) utilizind ca eluent metanolul. Se colecteaza fractiile care

L. Gh. ...

[Signature]

[Signature]

contin proantocianidina, se concentreaza si se evaporata la sec obtinindu-se un preparat proantocianidic brut. Acesta se dizolva in etanol si se supune unei cromatografieri pe coloana Sephadex LH-20 utilizind ca agent de dezvoltare etanol. Se obtin 2 fractii proantocianidinice care se concentreaza si se evaporata la sec rezultind proantocianidina B₂ si A₂ sub forma unor pulberi de culoare alb-galbuie. Aceste proantocianidine izolate si purificate se pot utiliza fie in forma in care se gasesc, fie dupa dizolvarea in apa, alcool sau solutie alcoolica adaugandu-se ca antioxidanti in diferite produse: alimente, produse farmaceutice, preparate cosmetice, uleiuri lubrifiante, materiale plastice, etc

Brevetul de inventie US 3,766,166/16.10.1973 propune un proces de obtinere a escinei solubile in apa, din orice tip de extract uscat de castane, prin cromatografie de adsorbție ; extractul uscat se dizolva intr-un amestec de n-propanol:acetat de etil: apa in rapoarte bine definite, urmata de trecerea solutiei pe oxid de aluminiu acid activat; eluatul ce contine escina solubila se usuca si se spala cu acetona; escina purificata obtinuta se prezinta ca o pulbere alba, amorfa, ce este caracterizata doar prin p.t.=218 °C; randamentul de obtinere in functie de tipul de extract uscat utilizat este cuprins intre 13,5-32,2%;

Brevetul de inventie RO 71026/16.03.1981 propune un procedeu de obtinere a escinei cristalizate de puritate farmaceutica prin extractia semintelor de Aesculus Hippocastanum cu un solvent organic miscibil cu apa –metanol, etanol, in proportie de 65%. Solutia extractiva obtinuta se trece pe o coloana cu schimbatori de ioni de tip cationit; eluatul ce paraseste coloana trebuie sa aiba pH-ul cuprins intre 3,5-3,8, se concentreaza sub vid, si se amesteca cu apa moment in care acidul escinic precipita sub forma unei substante cristaline ce se separa prin filtrare/centrifugare; pentru trecerea sub forma de sare-escinat , se trateaza cu o solutie bicarbonat de sodiu sau trietanolamina, ;escina sau escinatul de sodiu au o puritate de min.97%, cu max.3% acid escinic liber, obtinandu-se cu un randament de 1,5-2% fata de substanta introdusa in proces.

Cererea de brevet de inventie US 2006/0030697- prezinta obtinerea β-escinei din Aesculus indica, prin extractia cu o solutie apoasa alcoolica-metanol, etanol, in proportie 1:1-8:2, partitia intre faza apoasa si un alcool nemiscibil de preferat n-butanol sau n-propanol, tratarea fazei organice cu o solutie 0,5-1% NaOH, separarea fazei organice, trecerea acesteia pe alumina acida; eluatele organice ce contin β-escina se concentreaza pana se obtine o pudra amorfa, de puritate 90-95%., cu un randament de 2-3% .

Brevetul de inventie GB 1,116,890/12.06.1968 revendica un proces de preparare a saponinelor solubile din castan, prin conversia β-escinei in forma hidrosolubila α-escina; procesul se poate realiza atat pornind de la material vegetal proaspat-seminte de Aesculus

L. Blum

Blum
Blum
Blum

Hippocastanum, cat si de la β -escina, prin extractia hidroalcoolica 60% cu metanol sau etanol, la temperatura camerei, extractul obtinut se concentreaza si se adauga un agent precipitant NaOH , pH-ul ajunge la 6,7, solutia se trece pe o coloana cu rasini schimbatoare de cationi, efluentul acid obtinut se incalzeste la 90°C un timp scurt, solutia de escina solubila se centrifugheaza pentru a indeparta precipitatul de β -escina neconvertit, se concentreaza si se usuca, determinandu-se gravimetric cantitatea obtinuta- 85% saponina solubila in apa sub forma de α -escina;

Brevetul de inventie GB 933,657 prezinta un proces de obtinere a 2 escine izomere α si β din escina naturala, ce consta in convertirea escinei in forma acida libera, mentinerea solutiei de escina in aceasta forma la o temperatura cuprinsa intre 50-90 °C, pana cand precipitatul de β -escina este format complet si se separa solutia de α -escina prin filtrare/centrifugare. Lichidul se concentreaza si se usuca, se obtin 2 pudre albe α si β escina caracterizate prin p.t.specifice, prin indicii de refractie si prin gradul diferit de solubilizare.

Brevetul de inventie GB 929816 revendica izolarea escinei dintr-un extract hidroalcoolic 10% de castan utilizand pentru precipitare o solutie eterica de colesterol, mentinere la 90 °C, precipitatul saponina-colesterol se spala cu apa, se usuca se extrage cu eter, apoi cu metanol, solutia alcoolica obtinuta se purifica cu carbune activ , iar prin concentrare sub vid se obtine escinatul de sodiu 8%.

Brevetul de inventie GB 1 539 127/24.01.1979 revendica un proces de obtinere a escinei din fructele de castan prin extractia cu un amestec alcool alifatic saturat cu apa si apa saturata cu alcool alifatic de obicei n-butanolul, la pH= 3-4, separarea fazei organice si extractia escinei din aceasta cu o solutie apoasa alcalina , astfel incat pH-ul sa fie cuprins intre 5-5,5. Extractia escinei in faza apoasa este usurata prin adaugarea de acetat de etil.Se formeaza solutia de escinat de sodiu sau potasiu, care dupa decolorare se evapora si se concentreaza sub vid. Escina solubila in apa in forma acida se obtine prin dizolvarea in metanol si trecerea pe o coloana cu rasini schimbatoare de cationi; se obtine o pulbere alba cu Rf identic cu al etalonului, pt.=220-225 °C, si unghiul de rotatie specific. Un alt criteriu de calitate al escinei obtinute il reprezinta stabilitatea timp de 48 ore al solutiei 10% in apa.

Brevetul de inventie CA 921404/29.02.1973 revendica obtinerea unui concentrat bogat in escina, cu un continut de 40-50%, utilizat ca ingredient activ pentru obtinerea de capsule, tablete, drajeuri, unguente, supozitoare. Se utilizeaza extractia apoasa acida, urmata de purificarea cu un amestec de alcool cetona, apa

Brevetul de inventie CA 674987 revendica obtinerea celor doi izomeri ai escinei, prin formarea unui aduct cu colesterolul, separarea precipitatului format , transformarea in escinat

Efluent

104
104
104

de sodiu, separarea izomerilor pe rasini schimbatoare de cationi si centrifugare; se obtin 2m fractii distincte ale celor 2 izomeri .

Brevetul de inventie EP 1314432/28.05.2003 revendica obtinerea unui amestec de escina 95-99,5% β si 0,5-5% α prin care castanele macinate se extrag cu solutie metanolica la 40°C, cu agitare puternica, se aciduleaza cu acid oxalic iar precipitatul format se dizolva in alcool etilic la 55°C. Supernatantul se filtreaza , se trece pe o coloana cu schimbatori de cationi, eluatul se concentreaza , se adauga acetona mentinand 30 minute la 55°C si peste noapte la frigider . Se obtine un concentrat de escina, in care β - escina reprezinta 97% si 0,4% cenusa.

Brevetul de inventie EP 0298 148/ 11.01.1989 revendica obtinerea unui preparat de β -escina imbogatita , pornind de la fructe /seminte de castan conservate prin congelare, acestea se mentin 30 minute intr-o solutie apoasa ce contine conservanti(peroxi-monosulfat de potasiu, benzoat de sodiu , acid acetic) dupa care castanele se feliaza si se extrag cu apa . Tinctura apoasa astfel obtinuta se centrifugheaza, se acidifiaza cu acid sulfuric pH=2,5-2,8, cand precipita escina; pentru purificare, escina se dizolva in metanol si se decoloreaza cu carbune activ. Se obtine β -escina de puritate 88,1% cu un randament 1,78% raportat la cantitatea existenta materia prima.

Fata de brevetul de inventie propus de noi, procedeele de obtinere a extractelor din Hippocastani semen , conform brevetelor de mai sus, prezinta unele dezavantaje si deosebiri:

- utilizeaza solventi foarte inflamabili: eter etilic sau toxici: metanol;
- utilizeaza pentru separare coloane cu schimbatori de ioni, sau medii acide/alcaline, sau folosesc colesterolul pentru formare de aducti;
- urmaresc obtinerea preparatelor purificate sau concentrate in saponine-escina, considerand flavonele sau proantocianii drept impuritati;
- de multe ori preparatele obtinute sunt caracterizate doar prin date calitative: Rf cromatografic, solubilitati in diferiti solventi, nu si cantitative.

Din analiza datelor de literatura referitoare la procedee de obtinere a extractelor de **Trifolium pratense**, s-au identificat urmatoarele brevete de inventie:

- Brevetul de inventie CN 1683381 (A)/19.10.2005 prezinta un proces simplu de obtinere a unui extract obtinut din herba de trifoi rosu, prin extractie cu alcool si purificare; analiza HPLC determina un continut de nu mai putin 12% formononetina si soforicol;
- Brevetul de inventie GB 2483934 (A)/28.03.2012 prezinta obtinerea unui extract botanic utilizand un sistem apos de extractie subcritica, la o temperatura cuprinsa intre 150-200 grade Celsius;

Escina

Boz
Muzic
dey
SH

- Brevetul de inventie WO 99/48496 descrie un procedeu de obtinere a unei compozitii ce contine biochanina 9%, formononetina 8%, genisteina 1,5% si daidzeina 1%, prin extractia cu apa la 25 grade Celsius, timp de 3-4 ore, in atmosfera de azot, adaugare de alcool etilic, fierbere 3 ore; extractie cu heptan, in final obtinandu-se din 500 g planta 22 g extract. Procedeu nu este economic, nu este ecologic si nu poate fi aplicat industrial, utilizandu-se atmosfera de azot si solventi usor inflamabili.
- Brevetul de inventie US 7,033,621/25-04-2006 revendica obtinerea unei compozitii ce contine izoflavone in proportie de 36-70%: genisteina, daidzeina, formononetina, biochanina si gliciteina prin extractia cu apa, in care pentru hidroliza si obtinerea agliconilor se suplimenteaza cu enzime; extractia agliconilor se realizeaza cu acetat de etil, mentinandu-se un timp suficient de mare astfel incat izoflavonele libere sa treaca in faza organica.
- Brevetul de inventie CN 101239961/13.08.2008 propune o metoda de obtinere a izoflavonelor printr-o operatie de cataliza si hidroliza utilizand un lichid ionic puternic acid, cu o buna stabilitate termica si un strat solid de oxid de aluminiu sau silicagel; reactia de hidroliza se realizeaza in proportie de 100%;
- Brevetul de inventie CN 101407507/15.04.2009 prezinta o metoda de separare a izoflavonelor din extractele primare ce implica utilizarea unor rasini macroporoase AB-8. Extractul primar este dizolvat in metanol si este plasat intr-o coloana cromatografica. Izoflavonele din extractul primar sunt absorbite de rasilile macroporoase, o parte din impuritati se indeparteaza prin elutie cu o solutie alcoolica 10-20%, dupa care izoflavonele se elueaza cu o solutie etanolica 65-75%. Eluatele reunite se concentreaza sub vid, obtinandu-se un randament de 0,25-0,35 g izoflavone/1g extract primar.
- Brevetul de inventie CN 101766673/07.07. 2010 prezinta o metoda generala de extractie a izoflavonelor dintr-o planta orientala ce consta din extractia primara sub forma de decoct apos, urmata de extractia alcoolica, concentrare pentru indepartarea solventului organic, indepartarea impuritatilor prin extractie cu ciclohexan, dizolvarea rezidului prin incalzire in alcool, decolorare cu carbune la cald, filtrare, concentrare, uscare, macinare, obtinand un extract bogat in izoflavone ce se conditioneaza prin mixare cu PEG 4000, 6000, rasini poliacrilice, stearat de magneziu pentru a fi incapsulate;
- Cererea de brevet de inventie US 2010048689 /25.02.2010 propune obtinerea izoflavonelor din reziduuri ale industriei alimentare-derivati de soia, utilizand un proces enzimatic fermentativ cu tulpini de *Aspergillus* modificate genetic, prin care derivatii malonilati, acetilati sunt transformati in agliconul corespunzator.

Eftimie

Alina
B. B.
Scy
Alv

- Brevetul de inventie CN 101559094/21.10.2009 revendica un procedeu de extractie si separare a izoflavonelor din trifoiul rosu printr-o operatie dinamica cu solvent alcoolic cu grad mare, filtrare, concentrare, urmata de extractia cu un amestec de solventi, unul moderat hidrofob, polar si al doilea slab polar, cand are loc transferul ingredientilor activi in amestecul de solventi, concentrarea fazelor, adaugarea unui solvent slab polar pentru cristalizare, precipitatul este separat si procesat prin uscare sub vid.

- Brevetul de inventie CN 1013866133/18.03.2009 prezinta un procedeu de extractie a izoflavonelor din trifoiul rosu cu etanol, urmata de hidroliza alcalina, neutralizarea, purificarea, extractia cu acetat de etil, faza din care se separa izoflavonele prin concentrare sub vid.

- Brevetul de inventie CN 1709886/21.12.2005 revendica o metoda de extractie a totalului izoflavonoidic din trifoiul rosu prin: extractia plantei uscate si maruntite cu etanol la cald, in contracurent, extractele obtinute reunite se usuca iar solventul se recircula; urmeaza a doua extractie cu eter de petrol sau alt solvent pentru a indeparta faza lipidica uleioasa, uscarea filtratului, adaugarea de etanol, reextractia, purificarea pe oxid de aluminiu neutru, spalarea filtratului, extractia cu acetat de etil saturat, concentrarea fazei organice din care se obtine totalul izoflavonic.

- Brevetul de inventie EP 1391208/25.02.2004 propune un proces de preparare a unui extract de plante cu un continut ridicat in izoflavone de cel putin 40% ce consta din utilizarea unei succesiuni de solventi, astfel intr-o prima extractie cu apa, urmata de extractia cu metanol, acetona sau un alcool alifatic, acetat de etil obtinandu-se preparate din ce in ce mai concentrate in izoflavone. Se utilizeaza frunzele sau fructele de trifoi rosu; se pot utiliza toate metodele de extractie. Extractul obtinut se poate usca prin liofilizare; nu se dau informatii cu privire la randamentul de obtinere si nici date cantitative ale componentelor izoflavonice. Se precizeaza ca totalul izoflavonoidic este format din daidzeina, genisteina, formononetina, biochanina A si glicozidele ononina si sissostrina.

Procedeele de obtinere a extractelor din trifoi rosu, conform brevetelor de mai sus, prezinta unele dezavantaje:

- nu sunt ecologice, utilizand multi solventi toxici, sau inflamabili: eter de petrol, heptan, ciclohexan, acetona;
- se realizeaza la cald -150-200 grade Celsius, deci consum energetic mare, sau in instalatii costisitoare- sistem supercritic, in contracurent;
- pentru hidroliza se utilizeaza medii puternic alcaline/acide sau sisteme enzimatice costisitoare;

L. J. ...

*...
...
...*

- pentru purificare se utilizeaza rasini macroporoase , oxid de aluminiu, coloane cromatografice –sisteme ce nu se preteaza ridicarii la scara industrială;

- in general nu se dau date referitoare la randamentul de obtinere sau la caracterizarea chimica a preparatelor, ci doar se exprima in total izoflavone sau se enumera componentele prezente;

Referitor la obtinerea poliacetilenelor din materii prime vegetale, in mod special din **Radix Bardanae** se mentioneaza:

- Brevetul de inventie JP 3200736/02.09.1991 propune un procedu de obtinere a unui compus poliacetilenic din specii de Ginseng, prin extractia cu hexan, dietileter, eter de petrol, acetat de etil, metanol. Solventul este indepartat si reziduul este purificat pe o coloana cromatografica utilizand polimeri de tipul Diaion (R) HP-20, Sephadex, Silicagel, poliamida.

- Brevetul de inventie JP 3017043/25.011991 propune obtinerea din Buplerum falcatum a unui compus poliacetilenic, prin extractia cu hexan, distilarea si recuperarea solventului, reziduul obtinut se cromatografiază pe o coloana de celuloza, se elueaza cu hexan, si prin distilarea eluatelor se obtine produsul utilizat drept medicament.

- Brevetul de inventie JP 2172926/04.07 pentru obtinerea unui compus poliacetilenic se realizeaza o extractie supercritica cu bioxid de carbon, pentru a proteja tripla legatura, la temperatura 35-36 grade Celsius si 100-300kg/cm², pentru a imbunatati randamentul extractiei. Daca este necesar se mai realizeaza suplimentar o extractie cu cloroform.

Din analiza brevetelor de mai sus rezulta urmatoarele dezavantaje:

- nu se cunosc brevete de inventie de obtinere a produselor poliacetilenice din Radix Bardanae;

- se utilizeaza multi solventi inflamabili si toxici, in fazele de purificare ale extractelor, sau instalatii costisitoare (supercritica);

Din analiza stadiului tehnicii referitor la procedeele de obtinere a extractelor din **Centaureae cyanum herba**, rezulta urmatoarele:

- Brevetul de inventie LT 5784/25.10.2011 prezinta o compositie cosmetica utilizata pentru efectele antioxidante si de hidratare realizata prin combinarea a cel putin 3 extracte apoase dintre plantele: Camelia sinensis, Ginko biloba, Glycyrrhiza, Centaurea cyanus, Ruscus aculeatus.

- Cererea de brevet de inventie KR 20100031068/19.03.2010 prevede o compositie cosmetica de hidratare si catifelare obtinuta prin amestecarea unei serii de plante intr-un raport optim; astfel 0,05-1 parti din fiecare planta –Borago off., Centaurea cyanus, lavandula off., Salvia off. se amesteca si se supun extractiei la cald 80-120 grade Celsius, urmata de racirea la temperatura camerei.

L. E. K. K.

Handwritten signatures and initials, including "BEE" and "ALL".

- Brevetul de inventie JP 2007176877/12.07.2007 prezinta o compozitie medicinala de uz extern obtinuta prin utilizarea a cel putin unui extract dintre: *Bellis perennis*, *Artemisia dranunculus*, *Centaurea cyanus* utilizata pentru prevenirea sau ameliorarea diverselor simptome ce acompaniaza inflamatia, fotoimbatranirea pielii.
- Brevetul de inventie JP 2005306768 (A)- revendica o metoda de a inhiba producerea de melanina prin utilizarea unui preparat de uz extern, caracterizat printr-un amestec de extracte dintre: *Sophora flavescens*, *Centaurea cyani*, *Achillea millefolium*, *Tanacetum parthenium*.
- Brevetul de inventie EP 1632223/08.03.2006 propune un complex de substante cosmetice active pentru regenerarea pielii alcatuit dintr-un extract de *Centaurea cyani* 5-20% si un extract din seminte de soia 80-95% care sunt incluse intr-o compozitie cosmetica in raport 0,1-20%.

Utilizarea extractelor de albastrele este destul de redusa, extractele se realizeaza/utilizeaza in alte moduri/combinatii decat conform procedurii noastre

Brevetul rezova problema tehnica:

- de obtinere a unor **fitocompusi standardizati in mai multe componente active**, cu actiuni biologice complementare, in vederea **eficientizarii aplicatiilor terapeutice** ale acestora. Astfel, procedeele de extractie urmaresc un continut bine delimitat al urmatoarelor compusi asociati in extractele vegetale finale: compusi flavonoidici si agliconi izoflavonici; proantociani si saponine triterpenice; saponine triterpenice si flavonoide; acizi polifenol carboxilici si saponine triterpenice; acizi polifenol carboxilici si poliacetilene; acizi polifenol carboxilici si compusi flavonoidici.
- de valorificare ecologica a resurselor de plante medicinale, ce presupune cultivarea plantelor in sistem ecologic pentru obtinerea materiei prime vegetale necesare productiei de preparate fitoterapeutice;
- procedeele de extractie si separare a componentelor/extractelor active sunt simple obtinandu-se randamente optime si nu maxime conform principiilor tehnologiilor ecologice, cu valorificarea tuturor resurselor; prin parametrii tehnologici aplicati in instalatia de extractie se imprima o viteza mare de separare a componentelor din planta datorita amplasarii in interiorul buclei a unor pompe centrifuge de viteza mare determinand o scadere a timpului de extractie de la 4 ore la 2-3 ore/etapa;
- preparatele/ingrediente cosmetice active sunt standardizate in principiile active responsabile de actiunea biologica urmarita si dovedita prin teste specifice, in vitro;
- obtinerea extractului selectiv denumit **Dermo ET** izolat din **Herba Trifolium pratense**, conditionat sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol.

L. Z. Ghimbu

Alina
Bogdan
Sey
Ji
St

standardizat in compusi flavonoidici exprimati in quercetina de min.0,15 g/100 ml si in agliconii izoflavonici de min.0,23 g/100 mL ca suma a daidzeinei, genisteinei, formononetinei si biochaninei A, determinata cantitativ prin HPLC si anume: daidzeina min.10 mg/100 mL, genisteina min.20 mg/100 mL, formononetina min.140 mg/100 mL si biochanina A min.60 mg/100 mL, obtinut in raport 2:1-1:1 planta: extract final;

- obtinerea extractului selectiv - izolat **din Hippocastani semen**, conditionat fie sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, denumit **Dermo Cas** standardizat in proantociani de min.0,15 g/100 g si saponine triterpenice totale exprimate in escina de min.2 g/100 g, obtinut in raport 1:1 planta: extract final; sau sub forma de extract uscat sub forma unei pulberi galben-cafenii nehidroscoapice, denumit **Dermo Es**, standardizat in saponine triterpenice exprimate in escina de min.70%, si in flavonoide de min.2% obtinut in raport 33:1 planta: extract final;

- obtinerea extractului selectiv izolat **din Hedera helix folium**, conditionat fie sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, denumit **Dermo EH**, standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimati in acid cafeic de min.0,3 g/100g, si in saponine triterpenice totale exprimate in hederacozida C de min.3 g/100 g, obtinut in raport 1:1-1:2 planta : extract final, sau sub forma de extract uscat sub forma unei pulberi alb-cafenii, nehidroscoapice, standardizat in saponine triterpenice exprimate in hederacozida C de min.60 %, obtinut in raport 20:1 planta: extract final;

- obtinerea extractului selectiv izolat diin **Radix Bardanae**, cu proprietati antimicrobiene datorate prezentei poliacetilenelor, conditionat sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, denumit **Dermo B**, standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimati in acid cafeic de min.0,3 g/100 g, , obtinut in raport 1:1 planta: extract final;

- obtinerea extractului selectiv izolat din **Herba Centaurea Cyanus** conditionat sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, denumit **Dermo Abs**, standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimati in acid cafeic de min.0,9 g/100 g si in compusi flavonoidici exprimati in rutin de min.0,5 g/100 g, , obtinut in raport 1:1-1:2 planta: extract final;

- obtinerea unei game cosmetice prin asocierea originala a preparatelor fitoterapeutice a caror actiune biologica dovedita prin teste specifice, cumuleaza efectele de refacere a structurilor dermice, anti-edematos si anti-inflamator, si anume:

- Crema si gel anticelulitic
- Gel si crema cu efect antiedematos
- Ser si crema anticearcane

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]
[Handwritten signature]
[Handwritten signature]

Prin aplicarea acestui procedeu se valorifica tehnologic la nivel industrial potentialul terapeutic al materiilor prime vegetale care dupa recoltare se usuca si se se supun unei operatii de extractie primara comuna pentru toate materiile prime realizata cu alcool etilic de diferite concentratii in functie de componentul urmarit, ce variaza intre 40-96%; extractele obtinute se supun in continuare prelucrarii prin operatii de decolorare cu carbune activ, concentrare sub vid si conditionare in solventul cosmetic potrivit, in raportul stabilit obtinandu-se extractele selective fluide; in cazul extractelor uscate, dupa etapa de concentrare sub vid, produsul obtinut se supune unei separari selective cu unul din solventii adecvati: n-butanol, acetat de etil- extractele organice separate se prelucreaza in continuare prin concentrare sub vid, pana la reziduu uscat care se purifica prin suspendare in acetona, filtrare si uscare la temperatura scazuta, in curent de aer cald: 50-60 grade Celsius; extractele standardizate astfel obtinute se supun analizelor chimice de determinare a concentratiilor de substante active si a urmelor de solventi utilizati se conditioneaza fiecare dupa scopul de utilizare urmarit, devenind intermediari farmaceutic sau cosmetic activi.

Produsele obtinute conform prezentei inventii prin extractii si separari succesive din plantele *Trifolium pratense herba*, *Hedera helix folium*, *Aesculus hippocastanum semen*, *Radix bardanae*, *Centaurea cyanum herba* prezinta urmatoarele efecte cosmetic active: anti-celulitic, anti-edematos si anti- Cearcan.

TESTELE EFECTUATE ÎN VEDEREA EVIDENȚIERII ACTIVITĂȚII SPECIFICE ȘI EVALUĂRII APLICAȚIILOR ÎN TERAPEUTICĂ A COMPONENTELOR COSMETIC ACTIVE OBTINUTE DIN TRIFOI ROSU, IEDERA, CASTAN SI ALBASTRELE

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

- **Efectul antiinflamator la nivel de endoteliu vascular** s-a evidentiat pe linia specifica HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) datorita relevantei acesteia in simularea procesului inflamator la nivel de vas sanguin
- **Efectul de restructurare dermica** s-a testat pe fibroblasti dermici umani (HS 27), principalul tip celular responsabil de sinteza proteinelor structurale din matrixul extracelular, dintre care cele mai importante sunt colagenul de tip I si III.
- **Efectul fotoprotector** s-a demonstrat pe linia de keratinocite umane HaCaT, acest tip de celule formand epidermul, primul strat al tesutului cutanat, cu functie de bariera fata de actiunea nociva a radiatiei UV.

L. G. G. G.

Amu
sky
H
B
D

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

Linia celulara standardizata HS27 de fibroblasti dermici umani s-a utilizat intre pasajele 15-22. Testarea s-a realizat pe celule aderate timp de 48 h. in flask-uri de cultura de 12.5 cm², in mediu Dulbecco's modified Eagle's medium continand 10% ser fetal bovin, 1% antibiotic/antimycotic si incubate la 37⁰C in atmosfera de 5%CO₂. Actiunea substantelor s-a evaluat dupa 48h. de incubare.

Testele pe **linia endoteliala HUVEC** s-au realizat intre pasajele 2-9. Celulele s-au cultivat in mediu de cultura RPMI, suplimentat cu 1%antibiotic / antimicotic, 10% ser fetal bovin. Dupa 24 h. de aderare, celulele s-au tratat timp de 48h. cu extractele vegetale.

Demonstrarea efectului restructurant dermic al extractului de *Trifolium pratense*

Efectul s-a evidentiat pe culturi de fibroblasti dermici umani (linie celulara selectiva pentru efectul urmarit), prin date complementare la nivelul urmatoarelor mecanisme: stimularea sintezei de colagen si a ratei de multiplicare celulara, precum si **inducerea supraexpresiei integrinelor $\alpha1\beta1$ si $\alpha2\beta1$ (refacerea fermitatii structurilor dermo-epidermice).**

Extractul de trifoi, Dermo ET izolat din *Herba Trifolium pratense*, contine ca principii active daidzeina, genisteina, formononetina si biochanina A, astfel ca in demonstrarea actiunii sale s-a evaluat comparativ si activitatea acestor componente, precum si a combinatiei lor in dozele corespunzatoare extractului de trifoi.

a) Stimularea sintezei de colagen

Degradarea colagenului din matricea extracelulara se datoreaza in mare parte activitatii proteolitice a metaloproteinazelor (MMP-uri) ce sunt exprimate atat de fibroblastele dermice cat si de celulele inflamatorii, avand un rol important in remodelarea matriceala de la nivelul pielii supuse unui proces inflamator de lunga durata ce are drept consecinta pierderea integritatii matricei cu diminuarea elasticitatii pielii (30). Matrix metaloproteinazele (MMPs) sunt putin exprimate constitutiv in tesuturile normale ale adultilor, insa sunt supraexprimate de citokinele sau factorii de crestere in procesele fiziologice si patologice. Reglarea matricei extracelular implica un echilibru intre sinteza componentelor sale structurale si degradarea lor sub actiunea catalitica a MMP - urilor a caror functie biologica este modulata de inhibitori tisulari specifici (TIMP).

Eglin

Cristina
Scrie
AA

Substanta		Colagen		MMP			
		µg OH- Pro/2*10 ⁵ celule/ml		MMP9(pixeli)		MMP2(pixeli)	
Denumire	Doza		% de variatie		% de variatie		% de variatie
Martor celular		0,0712		90,84		94,26	
Martor solvent		0,0617		89,11		93,3	
Dermo ET	1/1000	0,1012	39,03	73,18	-21,8	94,61	1,4
	1/2000	0,0774	20,28	78,55	-13,4	94,32	1,1
Daidzeina	2.6 µM	0,0758	18,60	74,08	-20,3	90,61	-3,0
	1.3 µM	0,0761	18,92	73,83	-20,7	89,69	-4,0
Genisteina	3.4 µM	0,0325	-89,85	76,21	-16,9	91,95	-1,5
	1.7 µM	0,0287	-114,98	79,08	-12,7	92,98	-0,3
Biocianina	6.4 µM	0,0370	-66,76	81,52	-9,3	91,63	-1,8
	3.2 µM	0,0436	-41,51	72,71	-22,6	89,96	-3,7
Formononetin	32.7 µM	0,0583	-5,83	71,96	-23,8	95,95	2,8
	16.4 µM	0,0396	-55,81	77,11	-15,6	94,32	1,1
(Daidzeina+Genisteina+Biochani na+Formononetin) echivalent Dermo ET	1/1000	0,0786	21,50	92,95	4,1	96,71	3,5
	1/2000	0,0455	-35,60	91,04	2,1	95,86	2,7

Datele experimentale prezentate in Tabelul de mai sus demonstreaza ca dintre fitohormonii studiatii doar Daidzeina induce asupra celulelor fibroblastice mentinute in conditii normale de crestere atat biosinteza colagenului de tip I si III, cat si inactivarea enzimei proteolitice MMP9 ajutand astfel la remodelarea matriceala corecta a zonei afectate. Chiar daca ceilalti fitohormoni analizati individual au manifestat un efect inhibitor asupra enzimelor proteolitice matriceale procesul de biosinteza a colagenului nu a putut fi stimulat in prezenta lor, observandu-se astfel diminuarea concentratiei de proteina structurala in mediul de crestere. Cu toate acestea introducerea in mediul de crestere a fitohormonilor in diferite combinatii au potentat cu cel putin 13.5% efectele Daidzeinei, aspect observat si in cazul Dermo ET.

b) Stimularea ratei de multiplicare celulara

S-a testat efectul Dermo-ET asupra statusului proliferativ celular prin 2 tehnici complementare de analiza: secventialitatea ciclului celular si succesiunea generatiilor proliferative (citometrie in flux, marcare cu iodura de propidiu si respectiv CFSE - carboxy fluorescein diacetat succinimidil ester). Rezultatele s-au estimat ca Indice de Proliferare, respectiv suma procentelor de

L. Hlimb

B. B. /

gh

celule in fazele de multiplicare S si G2/M. calculate cu un soft de analiza specific (FACS Express V3 modulul DNA cell cycle si proliferare).

Substanta testata	%faza S+G2/M	% de variatie	Indice proliferare	% de variatie
MARTOR	18,5		2,4	
Martor solvent	19,5		2,6	
Dermo ET 1/1000	28,9	48,2	3,5	34,6
Dermo ET 1/2000	25,3	29,9	3,0	16,9
Formononetin echivalent Dermo ET1/1000	48,4	148,2	3,2	23,8
Biochanina echivalent Dermo ET 1/1000	47,2	142,1	3,9	48,8
Genisteina echivalent Dermo ET 1/1000	17,4	-10,7	3,3	27,3
Daidzeina echivalent Dermo ET 1/1000	27,8	42,6	3,5	33,8
(Daidzeina+Genisteina+Biochanina+Formononetin) echivalent Dermo ET 1/1000	56,1	187,7	5,4	106,5
(Daidzeina+Genisteina+Biochanina+Formononetin) echivalent Dermo ET 1/2000	54,0	176,9	5,1	95,4

Rezultatele demonstreaza accelerarea ratei de multiplicare celulara indusa de extractul de trifoi, Dermo ET, cu peste 30% fata de martorul corespunzator. Accelerarea fazei S si intrarea in mitoza este puternic influentata in special de formononetin si biochanina, daidzeina avand un efect slab, iar genisteina nefiind activa pe acest mecanism. In schimb raportul in care se gasesc cele 4 componente este optim pentru stimularea proliferarii celulare, acestea potentandu-se reciproc.

c) Inducerea supraexpresiei integrinelor $\alpha1\beta1$ si $\alpha2\beta1$ (refacerea fermitatii structurilor dermo-epidermice)

Integrinele sunt proteine functionale alcatuite din 2 subunitati glicoproteice (α si β) care se extind de-a lungul membranei capabile sa lege multipli liganzi, printre care si molecule din matrixul extracelular, avand un rol important in adeziunea celulara, miscarea si migrarea celulara. Integrina $\alpha1\beta1$ mediaza feed-back-ul de reglare a sintezei de colagen, realizand legaturi de tip celula-colagen sau celula-lamininal din matrixul extracelular, iar Integrina $\alpha2\beta1$ mediaza stimularea colagenazei de tip I (MMP1) cu rol in fibrilogeneza (organizarea colagenului in fibrile), leaga colagenul de tip I. Balanta intre Integrina $\alpha1\beta1$ si Integrina $\alpha2\beta1$ este importanta pentru mentinerea echilibrului intre degradarea si sinteza de colagen. [31, 32, 33].

Tehnica de evidentiare a integrinelor prin citometrie in flux presupune utilizeaza anticorpilor monoclonali pentru lanturile α si β (CD49a, marcat fluorescent pentru PE, corespunzator

Handwritten signatures and notes at the bottom right of the page.

subunitatii $\alpha 2$; CD49b, marcat fluorescent pentru FITC, corespunzator subunitatii $\alpha 1$; si CD 29 marcat fluorescent pentru APC, corespunzator subunitatii $\beta 1$).

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

Substanta testata	FITC-A Mean (CD 49b - Integrina alfa2)	% de variatie	PE-A Mean (CD 49a - Integrina alfa1)	% de variatie	APC-A Mean (CD 29 - Integrina beta1)	% de variatie
MARTOR	14448		5837		4167	
PG	15122	4,67	6330	8,45	4984	19,61
TGF beta 4ng/ml	44217	206,04	7005	20,01	8123	94,94
Dermo ET 1/1000	29921	107,09	4851	-16,89	3719	-10,75
Dermo ET 1/2000	25796	78,54	4092	-29,90	4314	3,53
Formononetin echivalent Dermo ET1/1000	14313	-0,93	3193	-45,30	2748	-34,05
Biochanina echivalent Dermo ET 1/1000	24491	69,51	3220	-44,83	3594	-13,75
Genisteina echivalent Dermo ET 1/1000	23269	61,05	3834	-34,32	4448	6,74
Daidzeina echivalent Dermo ET 1/1000	18954	31,19	3797	-34,95	3597	-13,68
(Daidzeina+Genisteina+Biochanina+Formononetin) echivalent Dermo ET 1/1000	27371	89,44	6830	17,01	5308	27,38
(Daidzeina+Genisteina+Biochanina+Formononetin) echivalent Dermo ET 1/2000	13679	-5,32	6726	15,23	5489	31,73

Testele au evidentiat actiunea extractului selectiv din **Herba Trifolium pratense**, Dermo ET, in maniera doza -efect, doar asupra inducerii supraexpresiei lantului glicoproteic $\alpha 2$, ceea ce indica o **amplificare a legaturilor fibroblast - collagen de tip I si stimularea activitatii colagenazei cu rol in fibrilogeneza**. S-a demonstrat faptul ca aceasta actiune este data in principal de biochanina si genisteina din componenta extractului, si intr-o mai mica masura de daidzeina, formononetinul neactionand la acest nivel. Efectul determinat este similar cu cel al martorului pozitiv (TGF beta 4ng/ml).

Rezultatele obtinute prin testarea extractului de trifoi prin cele trei mecanisme ale reconstructiei tesutului dermic demonstreaza rolul complementar al daidzeinei, genisteinei, formononetinului si biochaninei, precum si importanta combinatiei lor intr-un anumit raport pentru maximizarea efectului.

[Handwritten signature]

[Handwritten signatures]

Demonstrarea activitatii antiinflamatoare la nivel de endoteliu vascular a preparatelor fitoterapice din *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum*, *Arctium lappa* si *Centaurea cyanus*

Inflamatia vasculara este caracterizata de adeziunea intre limfocit si endoteliu declansata de exprimarea unor molecule de adeziune –markeri de inflamatie si secretia de citokine pro-inflamatorii: ICAM, caracteristic microvasculaturii si VCAM, specific vaselor mari de sange[34]

A fost **determinat efectul antiinflamator la nivel vascular** al preparatelor **Dermo –Abs, Dermo-B, Dermo-Es si Dermo-HdC**, comparativ cu un **martor pozitiv de Dexamethazona**, un agent antiinflamator cunoscut, in concentratie de 0.6µg/ml. [35]

Simularea „in vitro” a inflamatiei s-a realizat cu LPS (polizaharid de origine bacteriana, pentru a se mima conditiile asociate infectiei locale) si TNFα (stimul inflamator nespecific).

S-a evaluat expresia proteica a VCAM-1 SI ICAM-1 prin citometrie in flux: (marcarea fluorescanta cu anticorpii corespunzatori pentru ICAM-1 respectiv VCAM-1, *APC Mouse Anti-Human CD54 pentru evidentierea ICAM-1 (intracellular-adhesion molecule si PE-Mouse Anti-Human CD106 pentru evidentierea VCAM-1 (vascular-cell-adhesion molecule)*). Rezultatele se analizeaza comparandu-se media canalului de fluorescanta APC, respectiv PE pentru probele achizitionate. Rezultatele au fost comparate cu secretia *citokinelor inflamatorii umane (IL6 si IL8)*, exprimate in pg/ml (*marcarea si analiza cu kitul BD Cytometric Bead Array (CBA)- Human Inflammatory Cytokines kit (BD Pharmingen)*).

Rezultatele sunt prezentate in tabelele de mai jos:

'bstanta testata	celule nestimulate				celule stimulate LPS 1µg/ml				celule stimulate TNF alfa 2ng/ml			
	ICAM	% variatie	VCAM	% variatie	ICAM	% variatie	VCAM	% variatie	ICAM	% variatie	VCAM	% variatie
Martor celular	10882,6		1366,9		13974,4		1287,0		15697,5		1569,7	
Martor solvent (PG)	10436,0		1448,0		11789,0		1499,0		11053,0		1552,0	
Dermo-HdC 10µM	12443,3	14,3	1315,0	-3,8	12626,3	-9,6	1316,3	2,3	13275,0	-15,4	1399,5	-10,8

Legenda
 [Signature]

Dermo-HdC 15µM	12101,1	11,2	1302,0	-4,8	12182,3	-12,8	1478,1	14,8	13241,2	-15,6	1199,3	-23,6
Dermo-HdC 20µM	11941,2	9,7	1285,7	-5,9	12414,6	-11,2	1463,4	13,7	12036,7	-23,3	1201,9	-23,4
Escina 2µM	12494,9	14,8	1249,3	-8,6	13453,7	-3,7	1246,1	-3,2	16041,7	2,2	1491,2	-5,0
Escina 1µM	12784,2	17,5	1348,1	-1,4	12761,5	-8,7	1404,7	9,1	14093,3	-10,2	1157,0	-26,3
Escina 0,5µM	13008,5	19,5	1315,0	-3,8	12787,8	-8,5	1303,3	1,3	12340,6	-21,4	1344,9	-14,3
Dermo Abs 1/2000	11773,0	8,2	1480,0	8,3	10841,0	-22,4	1411,0	9,6	11058,0	-29,6	1526,0	-2,8
Dermo Abs /3000	11207,0	3,0	1319,0	-3,5	11766,0	-15,8	1440,0	11,9	10422,0	-33,6	1520,0	-3,2
Dermo Br 1/1000	9896,0	-9,1	1422,0	4,0	10378,0	-25,7	1306,0	1,5	10894,0	-30,6	1890,0	20,4
Dermo Br 1/2000	10244,0	-5,9	1456,0	6,5	10096,0	-27,8	1390,0	8,0	10439,0	-33,5	1541,0	-1,8
Dexametha zona 0,6ug/ml	10235,8	-5,9	1339,6	-2,0	11097,4	-20,6	1406,6	9,3	13095,0	-16,6	1131,0	-27,9

Substanta testata	celule nestimulate				celule stimulate LPS 1ug/ml				celule stimulate TNF alfa 2ng/ml			
	IL6 (pg/ml)	% variati e	IL8 (pg/ml)	% variati e	IL6 (pg/ml)	% varia tie	IL8 (pg/ml)	% varia tie	IL6 (pg/ml)	% varia tie	IL8 (pg/ml)	% varia tie
Martor celular	2054,5		2610,0		8166,1		4819,5		8543,4		5547,2	
Martor solvent	2084,0		2497,5		7990,3		4626,7		8602,3		5024,3	
Dermo-HdC 10µM	2543,6	23,8	2716,8	4,1	5295,6	-33,7	3273,8	-32,1	8037,9	-5,9	4971,6	-10,4
Dermo-HdC 15µM	2188,7	6,5	2328,9	-10,8	1961,2	-75,5	1206,2	-75,0	7346,8	-14,0	5026,6	-9,4
Dermo-HdC 20µM	2109,3	2,7	2185,1	-16,3	4013,7	-49,8	2943,8	-38,9	6262,6	-26,7	4293,5	-22,6

Effim

32

Amir
by Ali

Dermo-Es 2µM	1896,8	-7,7	2865,5	9,8	6722,9	-13,4	4483,1	-7,0	8900,7	4,2	5026,6	-9,4
Dermo-Es 1µM	2194,8	6,8	2819,5	8,0	3550,0	-55,6	2284,9	-52,6	9113,3	6,7	5997,2	8,1
Dermo-Es 0,5µM	2212,8	7,7	2447,4	-6,2	5335,5	-33,2	3475,2	-27,9	6639,2	-22,3	4495,0	-19,0
Dermo Abs 1/2000	1925,8	-6,3	2283,9	-12,5	5348,6	-33,1	2084,3	-56,7	6756,8	-20,9	2925,3	-47,3
Dermo Abs 1/3000	2195,6	6,9	2610,2	0,0	5558,2	-30,4	2353,6	-51,2	6314,1	-26,1	2608,8	-53,0
Dermo B 100	2369,4	15,3	3011,1	15,4	5746,5	-28,1	2539,2	-47,3	6808,3	-20,3	2757,5	-50,3
Dermo B 1/2000	2103,1	2,4	2699,4	3,4	5630,3	-29,5	2260,6	-53,1	6403,1	-25,1	2585,7	-53,4
Dexamethazon a 0,6ug/ml	1823,7	-11,2	1542,8	-40,9	2215,0	-72,3	1100,2	-77,2	3218,5	-62,3	1379,9	-75,1

Rezultatele arata o actiune diferentiata a Dermo-Es si Dermo-HdC, precum si a Dermo-B si Dermo-Abs, dupa cum urmeaza: Dermo-Es, Dermo-Abs si Dermo-B au efect antiinflamator in special la nivel de microvasculatura (inhiba expresia ICAM molecula caracteristica vaselor mici de sange si citokinele pro-inflamatorii IL6 si IL8), atat in conditii de inflamatie de origine bacteriana cat si in inflamatiile sistemice nespecifice; Dermo-HdC actioneaza in special la nivel de vase sanguine mari (inhiba VCAM), doar in inflamatia nespecifica.

Aceste efecte sustin asocierea Dermo-Es si Dermo HdC pentru un efect anti-inflamator generalizat la nivelul vasculaturii in cazul actiunii anticelulitice, utilizarea Dermo-HdC in produse de tip anti-edematos (inflamatie vasculara nespecifica pe vase sanguine mari), dar asociat cu Dermo-B prin componenta sa anti-microbiana si raspuns antiinflamaor la stimuli bacterieni, pentru preventia unor eventuale infectii locale. Asocierea dintre Dermo-Abs si Dermo-Es asigura un efect antiinflamator cumulat la nivel de microvasculatura dermica, inhibitia de catre Dermo-Es a citokinilor pro-inflamatorii IL6 si IL8 eliberate in conditii asociate unei infectii bacteriene fiind completata de actiunea Dermo-Abs manifestata si in cazul stimulilor pro-inflamatorii nespecifici.

Demonstrarea capacitatii de reducere a permeabilitatii vasculare a preparatelor fitoterapice din Hedera helix si Aesculus hippocastanum.

L. Gluck
2012
23-08-2012

Actiunea protectoare asupra vaselor sanguine se manifesta prin cresterea tonusului capilar produs de contractia muschilor netezi ai vaselor de sange, ceea ce duce la cresterea rezistentei si elasticitatii capilarelor si la scaderea permeabilitatii vasculare. Patologiile angiogenice sunt asociate cu aparitia edemelor, marindu-se permeabilitatea vasculara pentru apa si proteine cu mase moleculare mari care patrund astfel in spatiul extracelular. Unul din principalii modulatori ai acestui proces este factorul VEGF (vascular endothelial growth factor), cu dublu rol in angiogeneza si stimularea permeabilizarii vasculare, a carui inhibitie devine tinta terapeutica in diferite maladii vasculare.

Materialele si metoda folosita sunt: Human VEGF Flex Set (BD CBA) si Human Soluble Protein Master Buffer Kit (BD CBA). Kiturile utilizeaza pentru detectia analitilor solubili particule cu intensitati de fluorescenta diferite. Beads-ii de captura de o anumita intensitate de fluorescenta sunt legati de anticorpi specifici pentru o anumita protein solubila, in acest caz VEGF.

	VEGF pg/ml (Nestimulare)	% variatie	VEGF pg/ml (stimulare TNF alfa)	% variatie
Martor celular	39,3		71,4	81,4
DMSO	42,9		93,4	31,0
Dermo-Es 2uM	64,9	51,2	69,2	-3,0
Dermo-Es 1uM	46,2	7,5	80,1	12,2
Dermo-Es 0,5uM	48,2	12,3	95,7	34,1
Dermo-HdC 10uM	44,1	2,8	84,5	18,4
Dermo-HdC 15uM	30,4	-29,1	62,8	-12,0
Dermo-HdC 20uM	19,3	-55,1	42,1	-40,9
Dexametazona 0,6ug/ml	28,5	-27,5	48,2	-32,4

Componenta bioactiva Dermo-Es din extractul de Aesculus hippocastanum nu actioneaza asupra factorului VEGF in conditii inflamatorii (stimulare cu TNF α), in conditii bazale inducand chiar o activare a acestuia echivalenta cu permeabilizarea vaselor sanguine.

In contrast, Dermo-HdC din Hedera helix scade chiar cu 40% concentratia factorului VEGF actionand in sensul reducerii edemelor vasculare. Astfel, se recomanda includerea Dermo-HdC in formulari de produse cu efect anti-edematos si anti-inflamator, completand spectrul de actiune al Dermo-Es.

Demonstrarea activitatii antimicrobiene a preparatelor fitoterapice din Arctium lappa si Centaurea cyanus

Eflinck
Arctium
SKY
SW

Colonizarea microbiana reprezinta unul dintre evenimentele esentiale care stau la baza patogenzei multor afectiuni dermatologice, de multe ori asociate si cu inflamatiile vasculare. In culturile microbiene dezvoltate în condiții de aerobioză din leziuni cutanate pustulare și nodulo-chistice au fost izolate urmatoarele microorganisme: *Staphylococcus aureus* în 41% din cazuri, *S. epidermidis* în 53% și *Micrococcus* spp. în 45%, în timp ce din culturile anaerobe s-au izolat *S. aureus* în 39% din cazuri, *Propionibacterium acne* în 33% și *S. epidermidis* în 21%. (Hassanzaadeh et al., 2007) Pentru evidentierea efectului antimicrobian s-au ales ca microorganisme model 36 de specii aparținând genului *Staphylococcus*, evaluându-se potențialul antipatogenic al compusilor Dermo-B și Dermo-Abs după următoarele obiective:

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

La testarea calitativa prin metoda difuzimetrica s-a evidentiat prezenta unei inhibatii a cresterii microbiene la nivelul spotului de extract depus pe mediul de cultura insamantat. Metoda nu permite o apreciere semicantitativa a activitatii antimicrobiene datorita profilului de difuziune necunoscut prin mediul de cultura al compusilor. S-a determinat Concentratia minima inhibitorie (CMI) pentru Dermo-B și Dermo-Abs, raportate la continutul in acizi polifenol carboxilici (APFC) și flavone din extractele analizate:

Extract in PG din albastrele: APFC: CMI = 1.562 mg/mL pentru *S. aureus*; CMI = 3.12 mg/mL pentru *S. epidermidis*. Flavone: CMI = 0.86 mg/mL pentru *S. aureus*; CMI = 1.715 mg/mL pentru *S. epidermidis*

Extract in PG din brusture: APFC: CMI = 1.69 mg/mL pentru *S. aureus*; CMI = 0.84 mg/mL pentru *S. epidermidis*

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

L. Z. ...
B. ...
M. ...
Sey ...
M. ...

Demonstrarea activitatii fotoprotectoare fata de radiatia UV-A si UV-B a preparatelor fitoterapice din Trifolium pratense, Aesculus hippocastanum si Centaurea cyanus

Radiatia UV reprezinta o sursa principala de inflamatie la nivel cutanat, astfel incat am considerat necesar asocierea in produsele dermatocosmetice a unor fitocompusi ce intervin in contracararea efectelor nocive ale expunerii solare (Dermo-ET, Dermo-Es si Dermo-Abs).

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

Astfel, s-a demonstrat actiunea preparatelor ***Dermo-ET, Dermo-Es si Dermo Abs*** in patogeniza fotoimbatranirii printr-un screening al urmatorilor parametri celulari:

- **Inducerea apoptozei** declansata de modificari la nivel de ADN
- **Stress oxidativ celular** – activarea intracelulara a speciilor de oxigen reactive
- **Status inflamator:** secretia citokinelor pro-inflamatorii (IL6, IL8), a IL1- α ca indicator de sensibilizare si iritabilitate;
- **Secretia factorului VEGF** (vascular endothelial growth factor) – promotor de angiogeneza – etapa cheie in refacerea tesutului cutanat degradat si vindecarea ranilor.

Centralizarea efectelor cumulative fotoprotectoare ale compusilor testati este prezentata in tabelele de mai jos (comparativ cu martorul pozitiv N actil cisteina 10mM):

Stefan

Alina
Stefan
Alina

Substanta testata / Efect biologic	Iradiere UV-A										
	Protectie fata de apoptoza					Inhibitie IL1 α (pg/ml)	Inhibitie VEGF (pg/ml)	Inhibitie Citokine pro-inflamatorii		Inhibitie Stress oxidativ	
	% celule vii	% celule apoptoti ce timpurii	% celule apoptoti ce tarzii	% celule necrotice	IL6(pg/ml)			IL8(pg/ml)	Mediana canalului de fluorescenta FITC-A (H ₂ O ₂)	Mediana canalului de fluorescenta PE- A (O ₂)	
Martor celular	58.1	37.7	4.0	0.2	358,26	358,26	275,36	607,99	33502	28223	
Martor de solvent	56	39	4.5	0.4	392,72	392,72	279,37	564,68	30546	26871	
Dermo-ET 1/500	61.7	32.5	5.2	0.6	389,58	389,58	123,91	263,95	19609	15218	
Dermo-ET 1/1000	50.4	40.9	8.2	0.5	371,92	371,92	143,76	521,73	28321	18723	
Dermo-Es 1 μ M	61.1	24.9	13.9	1	298.3	381.3	132,06	494,36	25444	17594	
Dermo-Es 5 μ M	63.0	24.8	12.1	0.1	264.2	345.9	165,22	559,26	15731	13826	
Dermo-Abs 1/2000	49	45.1	5.6	0.4	335,28	335,28	265.3	588.9	24568	19877	
Dermo-Abs 1/3000	46.1	44.6	8.8	0.5	384,05	384,05	270.3	570.2	28445	24336	

2012-08-22
2012-08-22

Handwritten signatures and notes:
E. J. ...
S. ...
86

Handwritten signature:
S. ...

N-Acetil Cysteina	65,1	20,3	8,3	6,3	289,85	220,65	1058	1208	17896	16254
-------------------	------	------	-----	-----	--------	--------	------	------	-------	-------

9-2012-00318--
23-08-2012

Handwritten signatures and notes:
- *Sty*
- *ky*
- *ky*
- *ky*

Substanta testata / Efect biologic	Iradiere UV-B									
	Protectie fata de apoptoza				Inhibitie IL1α (pg/ml)	Inhibitie VEGF (pg/ml)	Inhibitie Citokine pro-inflamatorii		Inhibitie Stress oxidativ	
	% celule vii	% celule apoptoti ce timpurii	% celule apoptoti ce tarzii	% celule necrotice			IL8(pg/ml)	IL6(pg/ml)	Mediana canalului de fluorescenta FITC-A (H ₂ O ₂)	Mediana canalului de fluorescenta PE- A (O ₂ ⁻)
Martor celular	61.8	33	4.8	0.3	328,71	526,5	885,8	2105,68	31272	21415
Martor de solvent	56.9	40.2	2.4	0.5	349,97	511,0	991,22	2274,85	23052	20544
Dermo-ET 1/500	64.6	30.9	4.2	0.3	202,69	529,57	833,11	1725,04	23078	18823
Dermo-ET 1/1000	64.2	32.1	3.4	0.2	237,61	498,67	870,99	2241,54	27978	23417
Dermo-Es 1µM	68.2	28.4	2.4	1	248.3	507.6	571,48	1468,39	23467	18753
Dermo-Es 5µM	70.1	22.7	4.3	2.9	221.7	482.3	560,82	1583,99	28210	19944
Dermo-Abs 1/2000	71.8	24.6	3.5	0.1	203,89	152,23	822.1	2103.3	16537	8973
Dermo-Abs 1/3000	67.9	26.4	5.5	0.2	258,7	214,38	874.3	2244.2	20742	18544
N-Acetil Cysteina	71,1	23,3	5,3	0,2	289,85	320	458	1208	18774	15443

Handwritten signatures and notes:
 [Signature]
 [Signature]
 [Signature]

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

Extractul de trifoi, Dermo-ET are efect de protectie celulara fata de apoptoza indusa de radiatia UV, de stopare a procesului inflamator declansat prin semnalizarea citokinelor IL6 si IL8, antioxidant in special fata de UV-A.

Fitocompusul **Dermo-Abs** este activ in special in cazul iradierii UV-B: anti-apoptotic, anti-iritativ prin inhibitia IL1 α (citokina semnal pentru declansarea alergiilor) si anti-angiogenic prin inhibitia factorului VEGF. Fata de radiatia UV-A are doar efect antioxidant slab.

Dermo-Es este protector celular fata de apoptoza, anti-inflamator si anti-iritativ prin stoparea semnalizarii IL6, IL8 si IL1 α , atat in cazul UV-A cat si UV-B, antioxidant in special fata de UV-A.

Complementaritatea acestor efecte recomanda asocierea lor in produse dermatocosmetice de protejare a zonelor expuse.

Conform tehnologiei propuse se obtin 5 tipuri de preparate diferite ce reprezinta intermediari bioactivi pentru industria cosmetica, astfel pentru:

- extractul selectiv denumit **Dermo ET**: materia prima vegetala Herba Trifolium pratense recoltata in faza imediat inaintea sau dupa inflorire, se usuca in pat subtire, la intuneric, in curent de aer cald, se macina si se introduce in instalatia de extractie se extrage succesiv in trei trepte, cu alcool etilic 50-70% timp de 2 ore/treapta in instalatia de extractie rapida, solutiile obtinute analizate din punct de vedere al continutului de substante active izoflavone si flavone, se supun operatiilor de concentrare pentru recuperarea solventului si obtinerea extractului conditionat in propilenglicol, glicerina sau butilenglicol, solventi cosmetic admisi cu obtinerea preparatului Dermo ET sub forma unui lichid brun verzui limpede, cu miros caracteristic, standardizat in compusi flavonoidici exprimati in quercetina de min.0,15 g/100 ml si in agliconii izoflavonici de min.0,23 g/100 mL ca suma a daidzeinei, genisteinei, formononetinei si biochaninei A, determinate cantitativ prin HPLC si anume: daidzeina min.10 mg/100 mL, genisteina min.20 mg/100 mL, formononetina min.140 mg/100 mL si biochanina A min.60 mg/100 mL, obtinut in raport 2:1-1:1 planta: extract final;

- extractul selectiv denumit **Dermo Cas** – semintele de castan salbatic recoltate din zone geografice nepoluate, analizate din punct de vedere al metalelor grele si al pesticidelor, se usuca in curent de aer cald, se macina si introduc in instalatia de extractie; operatia de extractie se realizeaza succesiv in trei trepte, cu alcool etilic 50-70% timp de 2 ore/treapta in instalatia de extractie rapida, solutiile obtinute analizate din punct de vedere al continutului de substante active se supun operatiilor de concentrare pentru recuperarea solventului si

L. H. u.
B. S. y
min. 10
AL

obtinerea extractului conditionat in propilenglicol, glicerina sau butilenglicol, solventi cosmetic admisi cu obtinerea preparatului fluid, standardizat in proantociani de min.0,15 g/100 g si saponine triterpenice totale exprimate in escina de min.2 g/100 g, obtinut in raport 1:1 planta: extract final; pentru obtinerea extractului uscat dupa etapa de concentrare sub vid, pentru recuperarea solventului de extractie, produsul obtinut se supune unei separari selective cu unul din solventii adecvati: n-butanol, acetat de etil- in raport 2:1 extractele organice separate se prelucreaza in continuare prin concentrare sub vid, pana la reziduu uscat care se purifica prin suspendare in acetona, filtrare si uscare la temperatura scazuta, in curent de aer cald: 50-60 grade Celsius obtinandu-se o pulbere galben-cafenii nehidroscoapice, **denumit Dermo Es**, standardizat in saponine triterpenice exprimate in escina de min.70%, si in flavonoide obtinut in raport 33:1 planta: extract final;

- extractul selectiv **Dermo EH**- materia prima vegetala Hedera helix folium recoltata in perioada mai-octombrie, se usuca in pat subtire, la intuneric, in curent de aer cald, se macina si se introduce in instalatia de extractie, se extrage succesiv in trei trepte, cu alcool etilic 50-70% timp de 2 ore/treapta in instalatia de extractie rapida, solutiile obtinute analizate din punct de vedere al continutului de substante active se supun operatiilor de concentrare pentru recuperarea solventului si obtinerea extractului conditionat in propilenglicol, glicerina sau butilenglicol, solventi cosmetic admisi cu obtinerea preparatului fluid, standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimate in acid cafeic de min.0,3 g/100g, si in saponine triterpenice totale exprimate in hederacozida C de min.3 g/100 g, obtinut in raport 1:1-1: 2 planta; pentru obtinerea extractului uscat dupa etapa de concentrare sub vid, pentru recuperarea solventului de extractie, produsul obtinut se supune unei separari selective cu unul din solventii adecvati: n-butanol, acetat de etil- in raport 2:1 extractele organice separate se prelucreaza in continuare prin concentrare sub vid, pana la reziduu uscat care se purifica prin suspendare in acetona, filtrare si uscare la temperatura scazuta, in curent de aer cald: 50-60 grade Celsius obtinandu-se o pulbere alb-cafenie, **denumita Dermo HdC**, nehidroscoapica, standardizata in saponine triterpenice exprimate in hederacozida C de min.60 %, obtinuat in raport 20:1 planta: extract final ;

- extractul selectiv denumit **Dermo B**- materia prima vegetala- radacinile plantei Arctium lappa recoltate se spala bine cu apa, se usuca in pat subtire, la intuneric, in curent de aer cald, se macina si se introduc in instalatia de extractie, se extrag succesiv in trei trepte, cu alcool etilic 80-96% timp de 2 ore/treapta in instalatia de extractie rapida, solutiile obtinute analizate pentru identificarea poliacetilenelor prin analiza spectrala UV, dupa care se supun operatiilor de concentrare pentru recuperarea solventului si obtinerea extractului conditionat in

propilenglicol, glicerina sau butilenglicol, solvenți cosmetic admisi cu obținerea preparatului Dermo B sub forma unui lichid brun-roscat limpede, cu miros caracteristic, caracterizat prin prezența poliacetilenelor și standardizat în acizi polifenol carboxilici exprimați în acid cafeic de min.0,3 g/100 g, obținut în raport 1:1 planta: extract final;

- extractul selectiv **Dermo Abs**- materia primă vegetală- herba de albastrele recoltată imediat după înflorire, se usucă în pat subțire, la întuneric, în curent de aer cald, se macină și se introduce în instalația de extracție, se extrage succesiv în trei trepte, cu alcool etilic 60-80% timp de 2 ore/treaptă în instalația de extracție rapidă, soluțiile obținute analizate din punct de vedere al conținutului de substanțe active se supun operațiilor de concentrare pentru recuperarea solventului și obținerea extractului condiționat în propilenglicol, glicerina sau butilenglicol, solvenți cosmetic admisi cu obținerea preparatului Dermo Abs sub forma unui extract fluid, în glicerina, propilenglicol sau butilenglicol standardizat în acizi polifenol carboxilici exprimați în acid cafeic de min.0,9 g/100 g și în compuși flavonoidici exprimați în rutin de min.0,5 g/100 g, obținut în raport 1:1-1:2 planta: extract final;

Avantajele invenției în raport cu stadiul tehnicii sunt următoarele:

- Procedul tehnologic aplicabil la nivel industrial de obținere al preparatelor/ingredientelor cosmetice presupune cultivarea plantei în sistem certificat ecologic- pentru plantele care se pretează acestui sistem- obținerea materiei prime vegetale necesare extracției selective în trepte și separarea componentelor farmaceutice și cosmetice active, dar și reciclarea materiilor vegetale și a resurselor utilizate, prin obținerea a 5 preparate standardizate în principii active responsabile de acțiunea biologică urmărită și dovedită prin teste specifice, in vitro și anume:

- extract selectiv denumit **Dermo ET izolat din Herba Trifolium pratense**, condiționat sub forma de extract fluid, în glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat în compuși flavonoidici exprimați în quercetina de min.0,15 g/100 ml și în agliconii izoflavonici de min.0,23 g/100 mL ca suma a daidzeinei, genisteinei, formononetinei și biochaninei A, determinată cantitativ prin HPLC și anume: daidzeina min.10 mg/100 mL, genisteina min.20 mg/100 mL, formononetina min.140 mg/100 mL și biochanina A min.60 mg/100 mL, obținut în raport 2:1-1:1 planta: extract final;

- extract selectiv - izolat **din Hippocastani semen**, condiționat fie sub forma de extract fluid, în glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, denumit **Dermo Cas** standardizat în proantociani de min.0,15 g/100 g și saponine triterpenice totale exprimate în escina de min.2 g/100 g, obținut în raport 1:1 planta: extract final; sau sub forma de extract uscat sub forma unei pulberi galben-cafenii nehiproscopice, denumit **Dermo Es**, standardizat în saponine

E. Ghinea *Dr. C. M. M. M.* *Dr. C. M. M. M.*

triterpenice exprimate in escina de min.70%, si in flavonoide de min 2% obtinut in raport 33:1 planta: extract final;

- extract selectiv izolat **din Hedera helix folium**, conditionat fie sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol , **denumit Dermo EH**, standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimati in acid cafeic de min.0,3 g/100g, si in saponine triterpenice totale exprimate in hederacozida C de min.3 g/100 g, obtinut in raport 1:1-1: 2 planta : extract final, sau sub forma de extract uscat, **denumit Dermo-HdC**, sub forma unei pulberi alb-cafenii, nehigroscopice, standardizat in saponine triterpenice exprimate in hederacozida C de min.60 %, obtinut in raport 20:1 planta: extract final;

- extract selectiv izolat diin **Arctium lappa-radacini**, cu proprietati antimicrobiene datorate prezentei poliacetilenelor, conditionat sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol , **denumit Dermo B**, standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimati in acid cafeic de min.0,3 g/100 g , obtinut in raport 1:1 planta: extract final;

- extract selectiv izolat din **Herba Centaurea Cyanus** conditionat sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, **denumit Dermo Abs**, standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimati in acid cafeic de min.0,9 g/100 g si in compusi flavonoidici exprimati in rutin de min.0,5 g/100 g , obtinut in raport 1:1-1:2 planta: extract final;

- Obtinerea unor **fitocompusi standardizati in mai multe componente active**, in vederea **eficientizarii aplicatiilor terapeutice** ale acestora, dupa cum urmeaza: Dermo-ET- compusi flavonoidici si agliconi izoflavonici; Dermo-Cas – proantociani si saponine triterpenice; Dermo-Es- saponine triterpenice si flavonoide; Dermo-EH si Dermo-HdC - acizi polifenol carboxilici si saponine triterpenice; Dermo B - acizi polifenol carboxilici si poliacetilene; Dermo-Abs - acizi polifenol carboxilici si compusi flavonoidici.

- Inventia propune obtinerea, prin asocieri multiple, atat a principiilor active izolate din diferite plante intre ele, cat si a acestora cu cafeina (cunoscut agent lipolitic), a unor produse dermatocosmetice de tipul cosmeticeuticelor cu actiune cumulata de restructurare dermica si antiinflamatoare cutanata, utilizate in tratarea celulitei, a edemelor periferice si a cearcanelor. Eficienta acestor produse fitoterapice a fost verificata pe studii /teste de ultima generatie la nivel de celula tinta, asocierea lor bazandu-se pe complementaritatea mecanismelor de actiune demonstrate. Produsele dermatocosmetice sunt concepute astfel incat sa actioneze concertat pe toate caile metabolice implicate in patogeneza afectiunilor respective.

Procedeeul conform inventiei constă in asocierea ingredientilor cosmetici obtinuti, pentru un efect biologic superior, cumulativ, sinergic al principiilor active existente in preparatele fitoterapeutice realizate conform inventiei si anume: materiile prime vegetale dupa recoltare

L. H. H. H.

S. Z. H. H. H.

Pentru obtinerea preparatului Dermo EH- materia prima vegetala Hedera helix folium recoltata in perioada mai-octombrie, se usuca in pat subtire, la intuneric, in curent de aer cald, se macina si se introduce in instalatia de extractie, se extrage succesiv in trei trepte, cu alcool etilic 50-70% timp de 2 ore/treapta in instalatia de extractie rapida, in raport planta : solvent de extractie de 1:20-1:30, solutiile obtinute analizate din punct de vedere al continutului de substante active se supun operatiilor de concentrare intr-un raport 1:10-1:15 pentru recuperarea solventului si apoi pentru obtinerea extractului conditionat in propilenglicol, glicerina sau butilenglicol, solventi cosmetic admisi cu obtinerea preparatului fluid, standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimati in acid cafeic de min.0,3 g/100g, si in saponine triterpenice totale exprimate in hederacozida C de min.3 g/100 g, obtinut in raport 1:1-1: 2 planta; pentru obtinerea extractului uscat dupa etapa de concentrare sub vid, pentru recuperarea solventului de extractie, produsul obtinut se supune unei separari selective cu unul din solventii adecvati: n-butanol, acetat de etil- in raport 2:1 extractele organice separate se prelucreaza in continuare prin concentrare sub vid, pana la reziduu uscat care se purifica prin suspendare in acetona, filtrare si uscare la temperatura scazuta, in curent de aer cald: 50-60 grade Celsius obtinandu-se o pulbera alb-cafenii , nehigroscopice, standardizata in saponine triterpenice exprimate in hederacozida C de min.60 %, obtinuat in raport 20:1 planta: extract final ;

Pentru obtinerea preparatului Dermo B- materia prima vegetala- radacinile plantei Arctium lappa recoltate se spala bine cu apa, se usuca in pat subtire, la intuneric, in curent de aer cald, se macina si se introduc in instalatia de extractie, se extrag succesiv in trei trepte, cu alcool etilic 80-96% timp de 2 ore/treapta in instalatia de extractie rapida, in raport planta:solvent de extractie 1:10-1:15, solutiile obtinute analizate pentru identificarea poliacetilenelor prin analiza spectrala UV, dupa care se supun operatiilor de concentrare la reziduu uscat , pentru recuperarea solventului si obtinerea extractului conditionat in propilenglicol, glicerina sau butilenglicol, solventi cosmetic admisi cu obtinerea preparatului Dermo B sub forma unui lichid brun-roscat limpede, cu miros caracteristic, caracterizat prin prezenta poliacetilenelor si standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimati in acid cafeic de min.0,3 g/100 g , obtinut in raport 1:1 planta: extract final;

Pentru obtinerea preparatului Dermo Abs-materia prima vegetala- herba de albastrele Centaureae cyanum recoltata imediat dupa inflorire, se usuca in pat subtire, la intuneric, in curent de aer cald, se macina si se introduce in instalatia de extractie, se extrage succesiv in trei trepte, cu alcool etilic 60-80% timp de 2 ore/treapta in instalatia de extractie rapida, in raport planta:solvent de extractie 1:15-1:20, solutiile obtinute analizate din punct de vedere al

L. G. G. G.

S. G. G. G.

continutului de substante active se supun operatiilor de concentrare pentru recuperarea solventului in raport 1:10-1:20 si obtinerea extractului conditionat in propilenglicol, glicerina sau butilenglicol, solventi cosmetic admisi cu obtinerea preparatului Dermo Abs sub forma unui extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimati in acid cafeic de min.0,9 g/100 g si in compusi flavonoidici exprimati in rutin de min.0,5 g/100 g, , obtinut in raport 1:1-1:2 planta: extract final.

În continuare sunt descrise exemple de realizare a invenției, care se referă la procedeul de obținere al extractelor standardizate cosmetic active din plantele : *Trifolium pratense* herba, *Hedera helix* folium, *Aesculus hippocastanum* semen, *Arctium lappa* radix, *Centaurea cyanum* herba, la testele efectuate în vederea evidențierii activității specifice și evaluării aplicațiilor în terapeutică, precum și produsele dermato- cosmetice condiționate .

Exemplul de realizare 1. Procedeul de obtinere a preparatelor cosmetic active

Obtinerea preparatului Dermo ET- materia prima vegetala **Herba Trifolium pratense** recoltata in faza imediat inaintea sau dupa inflorire, se usuca in pat subtire, la intuneric, in curent de aer cald, se macina si se introduce in instalatia de extractie se extrage succesiv in trei trepte, cu alcool etilic 50-70% timp de 2 ore/treapta in instalatia de extractie rapida, in raport planta : solvent de extractie de 1:20-1:30, la temperatura ambianta, solutiile obtinute analizate din punct de vedere al continutului de substante active izoflavone si flavone, se supun operatiilor de concentrare intr-un raport 1:5-1:10, pentru recuperarea solventului si apoi pentru obtinerea extractului conditionat in propilenglicol, glicerina sau butilenglicol, solventi cosmetic admisi cu obtinerea preparatului Dermo ET sub forma unui lichid brun verzui limpede, cu miros caracteristic, standardizat in compusi flavonoidici exprimati in quercetina de min.0,15 g/100 ml si in agliconii izoflavonici de min.0,23 g/100 mL ca suma a daidzeinei, genisteinei, formononetinei si biochaninei A, determinate cantitativ prin HPLC si anume: daidzeina min.10 mg/100 mL, genisteina min.20 mg/100 mL, formononetina min.140 mg/100 mL si biochanina A min.60 mg/100 mL, obtinut in raport 2:1-1:1 planta: extract final;

Obtinerea preparatului Dermo Cas- Hippocastani semen semintele de castan salbatic recoltate din zone geografice nepoluate, analizate din punct de vedere al metalelor grele si al pesticidelor, se usuca in curent de aer cald, se macina si introduc in instalatia de extractie ;operatia de extractie se realizeaza succesiv in trei trepte, cu alcool etilic 50-70% timp de 2 ore/treapta in instalatia de extractie rapida, in raport planta : solvent de extractie de 1:10-1:15, la temperatura ambianta, solutiile obtinute analizate din punct de vedere al continutului de substante active se supun operatiilor de concentrare intr-un raport 1:5-1:10 pentru recuperarea solventului si apoi pentru obtinerea extractului conditionat in propilenglicol, glicerina sau

E. G. G. G.

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

butilenglicol, solvenți cosmetic admisi, cu obtinerea preparatului fluid, standardizat în proantociani de min.0,15 g/100 g și saponine triterpenice totale exprimate în escina de min.2 g/100 g, obținut în raport 1:1 planta: extract final; pentru obtinerea extractului uscat după etapa de concentrare sub vid, pentru recuperarea solventului de extracție, produsul obținut se supune unei separări selective cu unul din solventii adecvați: n-butanol, acetat de etil- în raport 2:1 extractele organice separate se prelucrează în continuare prin concentrare sub vid, până la reziduu uscat care se purifică prin suspendare în acetona, filtrare și uscare la temperatura scăzută, în curent de aer cald: 50-60 grade Celsius obținându-se o pulbere galben-cafenii nehidrogscopice, denumit Dermo Es, standardizat în saponine triterpenice exprimate în escina de min.70%, și în flavonoide de minim 2% obținut în raport 33:1 planta: extract final;

Obținerea preparatului Dermo EH- materia prima vegetala Hedera helix folium recoltată în perioada mai-octombrie, se usușă în pat subțire, la întuneric, în curent de aer cald, se macină și se introduce în instalația de extracție, se extrage succesiv în trei trepte, cu alcool etilic 50-70% timp de 2 ore/treaptă în instalația de extracție rapidă, în raport planta : solvent de extracție de 1:20-1:30, la temperatura ambiantă soluțiile obținute analizate din punct de vedere al conținutului de substanțe active se supun operațiilor de concentrare într-un raport 1:10-1:15 pentru recuperarea solventului și apoi pentru obtinerea extractului condiționat în propilenglicol, glicerina sau butilenglicol, solvenți cosmetic admisi cu obtinerea preparatului fluid, standardizat în acizi polifenol carboxilici exprimați în acid cafeic de min.0,3 g/100g, și în saponine triterpenice totale exprimate în hederacozida C de min.3 g/100 g, obținut în raport 1:1-1: 2 planta; pentru obtinerea extractului uscat după etapa de concentrare sub vid, pentru recuperarea solventului de extracție, produsul obținut se supune unei separări selective cu unul din solventii adecvați: n-butanol, acetat de etil- în raport 2:1 extractele organice separate se prelucrează în continuare prin concentrare sub vid, până la reziduu uscat care se purifică prin suspendare în acetona, filtrare și uscare la temperatura scăzută, în curent de aer cald: 50-60 grade Celsius obținându-se o pulberă alb-cafenii, nehidrogscopice, standardizată în saponine triterpenice exprimate în hederacozida C de min.60 %, obținut în raport 20:1 planta: extract final ;

Obținerea preparatului Dermo B- materia prima vegetala- radacinile plantei Arctium lappa recoltate se spală bine cu apă, se usușă în pat subțire, la întuneric, în curent de aer cald, se macină și se introduc în instalația de extracție, se extrag succesiv în trei trepte, cu alcool etilic 80-96% timp de 2 ore/treaptă în instalația de extracție rapidă, în raport planta:solvent de extracție 1:10-1:15, la temperatura ambiantă soluțiile obținute analizate pentru identificarea poliacetilenelor prin analiza spectrală UV, după care se supun operațiilor de concentrare la

E. G. G. G.

J. G. G. G.

J. G. G. G.

reziduu uscat , pentru recuperarea solventului si obtinerea extractului conditionat in propilenglicol, glicerina sau butilenglicol, solventi cosmetic admisi cu obtinerea preparatului Dermo B sub forma unui lichid brun-roscat limpede, cu miros caracteristic, caracterizat prin prezenta poliacetilenelor si standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimati in acid cafeic de min.0,3 g/100 g , , obtinut in raport 1:1 planta: extract final;

Obtinerea preparatului Dermo Abs-materia prima vegetala- herba de albastrele *Centaurea cyanum* recoltata imediat dupa inflorire, se usuca in pat subtire, la intuneric, in curent de aer cald, se macina si se introduce in instalatia de extractie, se extrage succesiv in trei trepte, cu alcool etilic 60-80% timp de 2 ore/treapta in instalatia de extractie rapida, in raport planta:solvent de extractie 1:15-1:20, la temperatura ambianta solutiile obtinute analizate din punct de vedere al continutului de substante active se supun operatiilor de concentrare pentru recuperarea solventului in raport 1:10-1:20 si obtinerea extractului conditionat in propilenglicol, glicerina sau butilenglicol, solventi cosmetic admisi cu obtinerea preparatului Dermo Abs sub forma unui extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimati in acid cafeic de min.0,9 g/100 g si in compusi flavonoidici exprimati in rutin de min.0,5 g/100 g , , obtinut in raport 1:1-1:2 planta: extract final;

Exemplul de realizare nr. 2 : Produs dermatocosmetic, continand ca substante biologice active produsul fitoterapic Dermo-ET **5.00÷12.00%** , produsul fitoterapic Dermo-HdC **0.50÷5.00%**(sau Dermo-EH in cantitatea corespunzatoare dozei active de Dermo HdC), produsul fitoterapic Dermo- Es **0.10÷0.70%** (sau Dermo-Cas in cantitatea corespunzatoare dozei active de Dermo Es) in asociere cu cafeina, conditionat sub forma de gel sau crema, utilizabil in **terapia anticelulita**.

Formula de conditionare (crema anticelulita):

Nr. crt.	INCI	Formula cantitativa
1.	Aqua	Ad 100
2.	Mineral Oil	3.00÷15.00
3.	Glyceryl Stearate	0.30÷3.00
4.	Lanolin	1.00÷5.00

Handwritten signatures and notes:
 2. Glicerina
 3.00 ÷ 15.00
 0.30 ÷ 3.00
 1.00 ÷ 5.00

5.	Petrolatum	2.00÷8.00
6.	Glycerin	3.00÷5.00
7.	Isopropyl miristate	1.00÷5.00
8.	Potassium Cetyl Phosphate	1.00÷5.00
9.	Dimethyl isosorbide	1.00÷5.50
10.	Cetyl Alcohol	1.00÷5.00
11.	Hedera Helix Extract	0.50÷5.00
12.	Aesculus Hippocastanum Extract	0.10÷0.70
13.	Trifolium pretense extract	5.00÷12.00
14.	Propylene Glycol (and) Diazolidinyl Urea (and) Methylparaben (and) Propylparaben	0.50÷1.00
15.	Sodium Hydroxide	0.15÷0.40
16.	Carbomer	0.15÷0.40
17.	Dimeticone	1.00÷3.00
18.	Tocopherol acetate	0.10÷0.50
19.	Parfum	0.10÷0.30
20.	BHA	0.02÷0.20
21.	Disodium EDTA	0.05÷0.20
22.	Caffeine	0.10÷0.50

Formula de conditionare (gel anticelulitic):

Nr.crt.	INCI	Formula cantitativa
---------	------	---------------------

L. Glimbu

Sey miristate
[Signature]

1.	Aqua	Ad.100
2.	Hedera Helix Extract	0.50÷5.00
3.	Aesculus Hippocastanum Extract	0.10÷0.70
4.	Dimethyl isosorbide	1.00÷5.50
5.	PEG -12	1.00÷10.00
6.	Trifolium pretense extract	5.00÷12.00
7.	PPG-26-Buteth-26(and)PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	0.50÷5.00
8.	Carbomer	0.10÷1.50
9.	Sodium Hydroxide	0.10÷1.50
10.	Diazolidinyl Urea (and) Methylparaben (and) Propylparaben (and) Propylene Glycol	0.50÷1.00
11.	Parfum	0.01÷0.20
12.	EDTA	0.05÷0.20
13.	Caffeine	0.10÷0.50

Produsul dermatocosmetic se va conditiona in doua variante destinate aplicarii topice, in functie de etapa de tratament corespunzatoare: crema de masaj, respectiv gel pentru o penetrare rapida a principiilor active in cazul aplicarii la domiciliu. Prin asocierea fitocompusilor biologice activi cu efecte complementare, produsul prezinta actiune anti-inflamatoare si de reducere a permeabilitatii la nivel vascular (Dermo-HdC si Dermo-Es), de reconsolidare a matricei extracelulare proteice cu rol suport si *accelerarea turn-overului celular al fibroblastilor*, cumulata cu efectul antioxidant si fotoprotector fata de radiatia UV-A si UV-B, inclusiv de stopare a angiogenezei (efecte cumulate ale compusului Dermo-ET), precum si de inhibitie a lipogenezei induse de cafeina, realizand astfel un atac concertat asupra tuturor cailor metabolice de progresie a celulei.

Exemplul de realizare nr. 3 : Produs dermatocosmetic, conținând ca substanțe biologice active produsul fitoterapeutic Dermo-ET **5.00÷12.00%**, produsul fitoterapeutic Dermo-HdC **1.00÷2.00 %**(sau Dermo-EH in cantitatea corespunzatoare dozei active de Dermo HdC),

L. Blin

12
[Signature]

produsul fitoterpic Dermo-B 1.00÷5.00%, condiționat sub formă de gel sau crema, utilizabil în **terapii alternative ale edemelor vasculare periferice.**

Formula de conditionare (gel anti-edematos) :

Nr.crt.	INCI	Formula cantitativa
1.	Aqua	Ad.100
2.	Glicerine	3.00÷5.00
3.	Hedera Helix Extract	1.00÷2.00
4.	Trifolium pretense extract	5.00÷12.00
5.	Radix bardanae extract	1.00÷5.00
6.	Dimethylisosorbide	0.50÷1.00
7.	Diazolidinyl Urea (and) Methylparaben (and) Propylparaben (and) Propylene Glycol	0.50÷1.00
8.	Carbomer	0.50÷1.50
9.	Sodium Hydroxide	0.50÷1.50
10.	Pentylene glycol	3.00÷5.00
11.	Parfum	0.15÷0.25
12.	EDTA	0.05÷0.10

Formula de conditionare (crema cu efect anti-edematos) :

Nr crt	FORMULA CANTITATIVA INCI	g/g %
1.	Aqua	Ad 100
2.	Mineral Oil	1.00÷10.00

L. Blinbe

Sty di
B. B. B.

3.	Cetareth-15 (and) Glyceryl Stearate	0.50÷5.50
4.	Petrolatum	2.00÷7.00
5.	Cetyl Alcohol	1.00÷4.00
6.	Glyceryl Stearate	0.50÷4.50
7.	Methyl Glucose Sesquistearate	0.7÷3.20
8.	Lanolin	1.00÷4.00
9.	Propylene Glycol (and) Diazolidinyl Urea (and) Methylparaben (and) Propylparaben	0.50÷1.00
10.	Potassium Cetyl Phosphate	0.25÷2.50
11.	Dimethylisosorbide	0.50÷2.00
12.	Polidimethylsiloxane	0.1÷0.50
13.	Hedera Helix Extract	1.00÷2.00
14.	Trifolium pretense extract	5.00÷12.00
15.	Radix bardanae extract	1.00÷5.00
16.	Parfum	0.05÷0.15
17.	Carbomer	0.10÷0.30
18.	Sodium Hydroxide	0.10÷0.30
19.	Tocopheryl Acetate	0.10÷0.50
20.	BHA	0.05÷0.10

Produsul dermatocosmetic cumuleaza actiunea anti-inflamatoare si de scadere a permeabilitatii la nivel vascular a Dermo-HdC, cu cea antimicrobiana, antioxidanta si anti-inflamatoare a Dermo-B, si cu efectul de restructurare dermica prin sinteza proteinelor structurale si accelerarea ratei de proliferare celulara indus de Dermo-ET , fiind recomandat cu precadere pentru atenuarea primelor forme de edem vascular periferic, sub forma de crema sau gel .

L. Blinbeu

[Handwritten signatures]

Exemplul de realizare nr. 4 : Produs dermatocosmetic, conținând ca substanțe biologice active produsul fitoterapic Dermo-ET $0.10\div 2.00\%$, produsul fitoterapic Dermo-Es $0.03\div 0.20\%$ (sau Dermo-Cas în cantitatea corespunzătoare dozei active de Dermo Es) , produsul fitoterapic Dermo-Abs $0.10\div 2.50\%$, condiționat sub formă de ser sau crema, utilizabil în **terapia hiperchromiei periorbitale (cearcanelor)**.

Formula de conditionare (ser anticearcane) :

Nr.crt.	INCI	Formula cantitativa
1.	Aqua	Ad.100
2.	Hydroxyethyl Acrylate / Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer	0.10÷0.90
3.	Isononyl isononanoate	5.00÷12.00
4.	Xylitylglucoside	3.00÷6.00
5.	EDTA	0.10÷0.50
6.	Phenethyl alcohol and Caprylyl glycol	0.60÷1.00
7.	Pentylene glycol	1.00÷5.00
8.	Trifolium pretense extract	0.10÷2.00
9.	Aesculus Hippocastanum Extract	0.03÷0.20
10.	Centaurea cyanus extract	0.10÷2.50
11.	Caffeine	0.10÷1.5

Formula de conditionare (crema contur ochi cu efect anticearcane) :

Nr.crt.	INCI	Formula cantitativa
1.	Aqua	Ad.100
2.	Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate	1.00÷3.00
3.	Glyceryl Stearate	1.00÷4.00

L. Zglimbe

SBZ
BIB
M

4.	Stearyl Alcohol	1.00÷3.00
5.	Dimethylisosorbide	1.00÷5.00
6.	Cyclopentasiloxane (and) dimethicone crosspolymer	1.00÷3.00
7.	Olive squalane	1.00÷4.00
8.	Bisabolol	0.10÷0.20
9.	Trifolium pretense extract	0.10÷2.00
10.	Aesculus Hippocastanum Extract	0.03÷0.20
11.	Centaurea cyanus extract	0.10÷2.50
12.	Carbomer	0.10÷0.50
13.	Sodium Hydroxide	0.15÷0.50
14.	Parfum	0.05÷0.20
15.	Phenoxyetanol(and)Potasium sorbat	0.50÷1.00
16.	Disodium EDTA	0.05÷0.20
17.	Caffeine	0.10÷1.5

Datorita asocierii fitocompusilor biologic activi cu efecte complementare si cumulative, produsul dermatocosmetic prezinta actiune dermo-restitutiva prin activitatea Dermo-ET (stimularea ratei de proliferare celulara, a sintezei de collagen prin inhibitia enzimelor degradative si a expresiei integrinelor responsabile de fermitatea tesutului cutanat), anti-inflamatoare si antioxidanta (Dermo-Abs si Dermo-Es), fotoprotectoare, inclusiv de inhibitie a angiogenezei declansate de radiatia UV (Dermo-Abs, Dermo-Es si Dermo-ET), si anti-iritanta (Dermo-Abs prin inhibitia citokinei IL1 α), fiind recomandat cu precadere pentru terapia hiperchromiei perioculare (cearcane), sub forma de crema sau ser .

L. Hlincea

Dr. Hlincea

ed

REVENDICARI

1. **Extract selectiv** denumit **Dermo ET** caracterizat prin aceea ca este izolat din Herba Trifolii, conditionat sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol , standardizat in compusi flavonoidici exprimati in quercetina de min.0,15 g/100 ml si in agliconii izoflavonici de min.0,23 g/100 mL ca suma a daidzeinei, genisteinei, formononetinei si biochaninei A, determinata cantitativ prin HPLC si anume:daidzeina min.10 mg/100 mL, genisteina min.20 mg/100 mL, formononetina min.140 mg/100 mL si biochanina A min.60 mg/100 mL, obtinut in raport 2:1-1:1 planta: extract final;
2. **Extract selectiv** denumit **DermoCas** caracterizat prin aceea ca este izolat din Hippocastani semen, conditionat fie sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat in proantociani de min.0,15 g/100 g si saponine triterpenice totale exprimate in escina de min.2 g/100 g, obtinut in raport 1:1 planta: extract final; sau sub forma de extract uscat sub forma unei pulberi galben-cafenii nehigroscopice ,denumit Dermo Es, standardizat in saponine triterpenice exprimate in escina de min.70%, si in flavonoide de min 2% obtinut in raport 33:1 planta: extract final;
3. **Extract selectiv** denumit **Dermo EH** caracterizat prin aceea ca este izolat din Folium Hederae Helicis, conditionat fie sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol , , standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimati in acid cafeic de min.0,3 g/100g, si in saponine triterpenice totale exprimate in hederacozida C de min.3 g/100 g, obtinut in raport 1:1-1: 2 planta : extract final, sau sub forma de extract uscat sub forma unei pulberi alb-cafenii, nehigroscopice, **denumit Dermo HdC**, standardizat in saponine triterpenice exprimate in hederacozida C de min.60 %, obtinut in raport 20:1 planta: extract final;
4. **Extract selectiv** denumit **Dermo B** caracterizat prin aceea ca este izolat diin Radix Bardanae. cu proprietati antimicrobiene datorate prezentei poliacetilenelor, conditionat sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat in acizi polifenol carboxilici exprimati in acid cafeic de min.0,3 g/100 g, , obtinut in raport 1:1 planta: extract final;
5. **Extract selectiv** denumit **Dermo Abs**, izolat din Herba Cyani conditionat sub forma de extract fluid, in glicerina, propilenglicol sau butilenglicol, standardizat in acizi polifenol

L. Glinh

Ry
BZ
Piriz

carboxilici exprimatii in acid cafeic de min.0,9 g/100 g si in compusi flavonoidici exprimatii in rutin de min.0,5 g/100 g, obtinut in raport 1:1-1:2 planta: extract final;

6. Procedeu de obtinere a produselor fitoterapeutice dermato-cosmetice definite in revendicarile 1-5 caracterizat prin aceea ca tehnologia valorifica la nivel industrial potentialul terapeutic al materiilor prime vegetale care dupa recoltare se usuca si se supun unei operatii de extractie primara comuna pentru toate materiile prime realizata cu alcool etilic de diferite concentratii in functie de componentul urmarit, ce variaza intre 40-96%; extractele obtinute se supun in continuare prelucrarii prin operatii de decolorare cu carbune activ, concentrare sub vid si conditionare in solventul cosmetic potrivit, in raportul stabilit obtinandu-se extractele selective fluide; in cazul extractelor uscate, dupa etapa de concentrare sub vid, produsul obtinut se supune unei separari selective cu unul din solventii adecvati: n-butanol, acetat de etil- extractele organice separate se prelucreaza in continuare prin concentrare sub vid, pana la reziduu uscat care se purifica prin suspendare in acetona, filtrare si uscare la temperatura scazuta, in curent de aer cald: 50-60 grade Celsius; extractele standardizate astfel obtinute se supun analizelor chimice de determinare a concentratiilor de substante active si a urmelor de solventi utilizati se conditioneaza fiecare dupa scopul de utilizare urmarit, devenind intermediari farmaceutic sau cosmetic activi.

7. Produse dermatocosmetice de tip anticelulitic, continand ca substante biologice active produsele fitoterapice Dermo-ET, Dermo-HdC (sau Dermo-EH), Dermo-Es(sau Dermo-Cas), asociate cafeinei, definite in revendicarea 1-3, conditionate sub forma de crema sau gel, care contin **5.00÷12.00%** Dermo-ET, **1.00÷2.00%** Dermo-HdC (sau Dermo-EH in cantitatea corespunzatoare dozei active de Dermo HdC), **0.10÷0.70%** Dermo-Es (sau Dermo-Cas in cantitatea corespunzatoare dozei active de Dermo Es), fiind aplicabile in terapia **afectiunilor de tip lipodistrofic**.

8. Produse dermatocosmetice de tip antiedematos, continand ca substante biologice active produsele fitoterapice Dermo-ET, Dermo-B, Dermo-HdC (sau Dermo-EH), definite in revendicarea 1-4, conditionate sub forma de crema sau gel, care contin **5.00÷12.00%** Dermo-ET, **1.00÷5.00%** Dermo-B, **1.00÷2.00%** Dermo-HdC (sau Dermo-EH in cantitatea corespunzatoare dozei active de Dermo HdC), fiind aplicabile in **terapia asociata a edemelor vasculare periferice**.

9. Produse dermatocosmetice de tip anticearcane, continand ca substante biologice active produsele fitoterapice Dermo-ET, Dermo-Abs, Dermo-Es (sau Dermo-Cas), definite in

L. H. H. H.

B. B. B. B.

revendicarea 1-5, condiționate sub formă de cremă sau ser, care conțin **0.10÷2.00%** Dermo-ET, **0.10÷2.50%** **Dermo-Abs**, **Dermo-Es 0.03÷0.20%**(sau Dermo-Cas în cantitatea corespunzătoare dozei active de Dermo Es) , fiind aplicabile în **terapia hiperchromiei periorbitale (cearcanelor)**.



Stambura

BBB
SR
Auror
Auror