



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00228

(22) Data de depozit: 04/05/2022

(41) Data publicării cererii:
29/11/2023 BOPI nr. 11/2023

(71) Solicitant:
• HOFIGAL EXPORT - IMPORT S.A.,
INTRAREA SERELOR NR.2, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• NEAGU MIHAELA, BD.1 DECEMBRIE
1918 NR.51, BL.J38, SC.B, AP.18,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• LUNTRARU CRISTINA- MIHAELA,
STR. GH. C. MOISIL NR. 6, BL. 10, SC. 2,
ET. 7, AP. 91, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;

• SUCIU ALEXANDRU, STR. ANTON PANN
NR. 11, MEDIAȘ, SB, RO;
• TOMESCU JUSTINIAN-ANDREI,
PIAȚA PACHE PROTOPOPESCU, NR13,
ET.1, AP.2, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• POP SEVINCI, STR.POIANA, NR.4, AP.12,
SIBIU, SB, RO;
• MANOLE EMILIA, STR.TÂRGU NEAMȚ,
NR.2A, BL.31, SC.A, ET.4, AP.20,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• ALBULESCU LUCIAN, STR. ROȘIA
MONTANĂ NR. 6, BL. 07, SC. C, ET. 2,
AP. 125, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• TĂNASE CRISTIANA,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.126, BL.P 34,
SC.1, AP.30, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) SUPLIMENTE ALIMENTARE RECOMANDATE
PENTRU ATENUAREA SIMPTOMELOR NEPLĂCUTE ALE
MENOPAUZEI, PROCEDU DE OBȚINERE ȘI PROCEDURE
DE STABILIRE A BIO-SIGURANȚEI ȘI EFICACITĂȚII
BIOLOGICE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor suplimente alimentare complementare sub formă de capsule pentru atenuarea simptomelor neplăcute ale menopauzei și un procedeu de stabilire a bio-siguranței și eficacității biologice. Procedeu, conform invenție, constă în amestecarea într-un granulator a 24...27,5 g frunze și flori de Trifoi roșu, uscate și măcinate la 35...40°C, 9,50 g extract standardizat de Trifoi roșu cu un conținut de isoflavone de 8% și 18,75...26,50 g parte aeriană de Salvie, uscată la 35...40°C, până la 28 g parte aeriană de Talpa Gâștei, respectiv, 23,35 g conuri de hamei, urmată de omogenizare, rezultând din granu-

lator o masă solidă peste care se pulverizează 60...70 g extract concentrat de Trifoi roșu sau 15...20 g extract concentrat de Salvie, amestecul se usucă și se macină până la o granulație de 200 μm cu omogenizare timp de 30 min, pulberea rezultată se amestecă cu până la 3,75 g drojdie de bere și cu excipienți uzuali de condiționare pentru formule de zi/noapte, complementare, având conținut de isoflavone în concentrație totală de 0,87% (formula de zi), respectiv, conținut de polifenoli, în concentrație totală de 0,199% (formula de noapte).

Revendicări: 6

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).



**SUPLIMENTE ALIMENTARE RECOMANDATE PENTRU ATENUAREA
SIMPTOMELOR NEPLĂCUTE ALE MENOPAUIZEI, PROCEDEU DE OBTINERE ȘI
PROCEDEE DE STABILIRE A BIO-SIGURANȚEI ȘI EFICACITĂȚII BIOLOGICE**

Prezenta invenție se referă la obținerea a două suplimente alimentare complementare, sub formă de capsule, realizate în două formule, una pentru administrare pe timp de zi și cealaltă pentru administrare pe timp de noapte, cu rol în atenuarea simptomelor neplăcute ale menopauzei. Ambele preparate non-hormonale sunt destinate funcționării optime a organismului feminin, în toate cele patru etape ale menopauzei (*perimenopauză*, *premenopauză*, *menopauză*, *postmenopauză*) (1).

Produsele naturale care fac obiectul prezentei invenții au la bază extracte concentrate de plante medicinale bogate în substanțe bioactive, minerale și vitamine, care ajută la funcționarea normală a organismului feminin pe tot parcursul zilei (24 ore) și oferă o alternativă naturală comparativ cu terapia de substituție hormonală.

Noutatea acestor produse, conform invenției constă în principiile active din extractele concentrate din plante medicinale, *Trifoi roșu*, *Talpa găștei*, *Salvie* și *Hamei*, bogate în substanțe biologic active din grupele principale de **fitoestrogeni** (*izoflavone*, flavone, lignani, stilbenoide, comestani), cu acțiune estrogenică rapidă și eficiență maximă, fără efecte nedorite asupra organismului femeii (2).

Menopauza este perioada din viața fiecărei femei marcată de dispariția ciclului menstrual, un proces care apare din cauza reducerii secreției hormonale ovariene, un fenomen natural sau, uneori, indus prin procedee chirurgicale, chimioterapie, iradiere. În prezent, datorită stresului și a altor factori de mediu, un procent de 1% din femei prezintă menopauza precoce și prematură (perioada de perimenopauză) la vârsta normală de reproducere. Vârsta medie a debutului **perioadei de tranziție la menopauză este de 47,5 ani și durează de obicei 4-5 ani** (3, 4). De fapt, este o perioadă analizată din ce în ce mai mult din punctul de vedere al simptomelor și semnelor deficienței estrogenice. Menopauza se poate întinde până la 60 – 65 de ani, după care urmează perioada de senescență. De fapt, manifestările menopauzei sunt consecința, atât a procesului de îmbătrânire, precum și a disfuncției ovarelor, a suprarenalei (adrenopauza), care se instalează treptat și, în raport cu particularitățile fiecărei persoane determină intensitatea simptomatologiei și afectările organice.

Estrogenul este un hormon steroid feminin, cu un rol esențial pentru sistemul reproducător, dar care reglează și alte funcții ale organismului, atât la femei, cât și la bărbați. El

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr.a..... 2022 00 2028
04-05-2022
Data depozit

este implicat în procesul de apariție a caracteristicilor sexuale feminine la pubertate și contribuie la menținerea sănătății organelor sexuale și la sănătatea oaselor (8).

Atunci, când femeile ajung la menopauză, producția de estrogen scade și se confruntă cu o serie de efecte neplăcute, ca de exemplu: bufeuri, dureri de cap sau accentuarea migrenelor dacă sunt prezente și înainte de menopauză, pierderea elasticității și lubrefierii vaginale, scăderea elasticității pielii, oboseală, modificări ale dispoziției etc.

În ultimii ani, studiile științifice au demonstrat capacitatea fitoestrogenilor de a acționa ca alternativă în terapia de substituție hormonală pentru tratamentul osteoporozei și contracararea efectelor neplăcute ale menopauzei.

De asemenea, fitoestrogenilor le sunt atribuite numeroase beneficii pentru sănătate: pe lângă reducerea simptomelor neplăcute ale menopauzei (bufeuri și osteoporoză), scăderea riscului de boli cardiovasculare, sindromul metabolic, diabetul de tip 2, diferite tipuri de cancer (cancer de sân, cancer colorectal etc.). Răspunsul benefic al fitoestrogenilor pentru sănătatea organismului femeii pare să fie complex și depinde de o serie de factori, ca: vârsta persoanei, starea de sănătate, tipul de fitoestrogeni folosiți, concentrația și doza acestor fitoestrogeni, prezența sau absența unei anumite bacterii la nivelul florei intestinale.

Pentru menținerea sănătății femeii, există în prezent mai multe suplimente alimentare sau preparate fitofarmaceutice destinate ameliorării simptomelor neplăcute ale menopauzei, fiind prezentate sub diferite forme farmaceutice, cum ar fi: "*Climanium day & night*" – *Zdrovit* (28 comprimate + 28 comprimate), "*Femovita forte*" – *Naturpharma* (zi & noapte) (30 capsule + 30 capsule), *Menopauză – Fares* (60 comprimate), *Menopausal Formula – Calivita International* (135 capsule), *Menopauza Suport Flash Fighters – Puritan's Pride Inc USA* (100 comprimate), *Femovita* (30 capsule), etc.

Avantajele celor două formule ale produselor realizate conform invenției sunt proprietățile semnificative antioxidante, antiinflamatoare, antimicrobiene, antialergice, calmante și de stimulare a creșterii imunității locale și generale ale organismului femeii.

Formulele realizate conform invenției acționează sinergic, iar compușii bioactivi conferă o acțiune estrogenică, de reglare a balanței hormonale, de reducere a osteoporozei, menopauza contribuind la pierderea densității osoase și încetarea ciclului menstrual din cauza scăderii treptate și ireversibile a producției de hormoni sexuali ovarieni (estrogenul și progesteronul), principiile active fiind într-o combinație nouă, neîntâlnită în literatura de specialitate (5,6).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este realizarea unor produse în care asocierea materiilor prime din plante medicinale, sub formă de pulberi, cu extractul standardizat de Trifoi roșu, cu conținut în isoflavone 8%, duce la obținerea a două formule de suplimente

alimentare, pentru zi și pentru noapte, cu rol în atenuarea simptomelor neplăcute ale menopauzei, precum bufeurile, transpirațiile nocturne, starea de oboseală, durerile de cap, etc.

Formulele produselor realizate conform invenției pentru zi și noapte se bazează pe extracte concentrate din plante, reprezentative prin conținutul în **diverse clase de fitoestrogeni** (**izoflavone**, flavone, lignani, stilbenoide, coumestani), substanțe care pot acționa ca estrogeni naturali și ajută la înlăturarea acelor simptome neplăcute ale menopauzei (7).

Produsele conform invenției cu rol de suplimente alimentare în atenuarea simptomelor neplăcute din perioada de menopauză au în compoziție **4 specii de plante medicinale obținute din cultura proprie a companiei Hofigal Export Import SA** și conțin grupele de fitoestrogeni necesare pentru ca organismul să poată face față tuturor tulburărilor cauzate de menopauză, atât cele neuropsihice, precum: bufeuri, transpirații, cefalee, amețeli, insomnie, cât și cele neurovegetative, care includ: depresie, iritabilitate, anxietate și dificultăți de concentrare, pe tot parcursul zilei. În plus, substanțele fitoestrogenice ajută la reducerea resorbției osoase și la creșterea densității osoase, susțin buna funcționare a sistemului cardiovascular și imunitar și au un efect benefic asupra metabolismului lipidelor și asupra elasticității pielii.

Astfel, **produsele realizate conform invenției**, conțin materii prime sub formă de pulbere, din plante medicinale cu rol estrogenic, benefice în perioada menopauzei, și anume: *flori și frunze de Trifoi roșu (Trifolium pratense L.)*, *partea aeriană de Salvie (Salvia officinalis L.)*, *partea aeriană de Talpa găștei (Leonurus cardiaca L.)*, *conuri de Hamei (Humulus lupulus L.)* și excipienții admiși în industria farmaceutică, fiind condiționate sub formă de capsule.

Produsul pentru administrare pe timp de zi, realizat conform invenției conține un extract concentrat din frunze și flori de Trifoi roșu 60....70 g, pulbere din frunze și flori de Trifoi roșu 20.....25 g, extract standardizat de Trifoi roșu (cu un conținut de izoflavone 8%) 8.....12 g, pulbere din partea aeriană de Salvie 20.....30 g, pulbere din partea aeriană de Talpa găștei 25.....30 g și excipienți admiși în industria farmaceutică, fiind condiționat sub formă de capsule.

Produsul administrat pe timp de noapte, realizat conform invenției conține un extract concentrat din parte aeriană de Salvie 15....25 g, pulbere din partea aeriană de Salvie 15....20 g, pulbere din flori și frunze de Trifoi roșu 25.....30 g, extract standardizat de Trifoi roșu (cu un conținut de izoflavone 8%), 8.....12 g, pulbere din conuri de Hamei 15.....25 g, pulbere de drojdie de bere 3.....5 g și excipienți admiși în industria farmaceutică, fiind condiționat sub formă de capsule.

1. **Materialul vegetal uscat din frunzele și florile de Trifoi roșu (*Trifolium pratense* L.), Familia Fabaceae**

Trifoiul roșu (*Trifolium pratense* L.) este o plantă furajeră și medicinală perenă, cu o tulpină ce poate atinge până la un metro înălțime, fiind muchiată și doar puțin ramificată. Frunzele sunt trifoliolate, florile au culoarea roșie, violacee sau albăstruie, grupate în capitule ovale. Este considerată ca una din cele mai bogate surse de **izoflavone**, substanțe solubile în apă care acționează ca estrogeni. De aceea, trifoiul roșu este folosit ca remediu pentru bufeuri, sindromul premenstrual, sănătatea sânilor, benefic în reducerea colesterolului sanguin, îmbunătățirea producției de urină și a circulației sângelui, prevenirea osteoporozei, diminuarea riscului de formare a cheagurilor de sânge, a plăcii arteriale și a dezvoltării hiperplaziei de prostată benignă.

Trifoiul roșu este și o sursă de nutrienți valoroși, ca de exemplu calciu, crom, magneziu, niacină, fosfor, potasiu, tiamina și vitamina C.

Există dovezi științifice că **izoflavonele** din frunzele și florile de trifoi roșu pot ajuta la tratarea simptomelor premenopauzei și menopauzei, precum bufeurile și transpirațiile nocturne, la îmbunătățirea densității minerale osoase și la scăderea riscului de osteoporoză și probleme legate de inimă, cum ar fi colesterolul crescut și hipertensiunea arterială.

Izoflavonele majore găsite în trifoiul roșu includ **genistein, daidzein, formononetin și biochanin-A**. Izoflavonele au proprietăți asemănătoare estrogenului datorită activării receptorilor de estrogen (9, 10).

Trifoiul roșu conține și tocoferol, o formă de vitamina E, care a fost asociat cu reducerea riscului de atac de cord și de cancer (11-15).

Compoziție chimică: florile și frunzele de trifoi roșu, (*Trifolium pratense* L.) conțin o cantitate mare de saponozide triterpenice, flavonoide – (izoflavone cu acțiune estrogenică), acizi fenolici, acid salicilic, cumarine, fitosteroli, ulei volatil, proteine, albumină, grăsimi, β -caroten, celuloză, lecitină, vitaminele: A, E, C, B₂ și B₃, substanțe minerale, etc.

Isoflavonele din florile și frunzele de trifoi roșu, (*Trifolium pratense* L.) au un efect benefic și asupra sintezei colesterolului de tip HDL, dacă este administrat atât femeilor aflate în premenopauză cât și ale celor care au ajuns la menopauză. De asemenea, prin faptul că echilibrează nivelul de estrogen, hormon feminin care conferă protecție împotriva bolilor cardiovasculare, trifoiul roșu este recomandat ca protector al inimii. Nivelul scăzut de estrogen este asociat și cu osteoporoza, afecțiune care constă în scăderea densității osoase după instalarea menopauzei. La menopauză, nivelul de estrogeni, hormoni protectori ai țesutului osos este sintetizat în cantități din ce în ce mai mici, în timp ce corticosteroidii, hormoni care cresc

resorbția osoasă, se sintetizează în cantități constante. Prin urmare, rata de pierdere a țesutului osos este mai mare decât cea de consolidare și se ajunge la fragilitate osoasă. *Soluția constă în echilibrarea nivelului de estrogen, iar trifoiul roșu intervine prin aportul de isoflavone, adică de fitohormoni care au efect estrogenic în organism.*

2. Materialul vegetal uscat din frunzele de Salvie (*Salvia officinalis* L.) Familiei Lamiaceae

Salvia, cunoscută și sub denumirea populară de *jaleș* sau *salvia de grădină*, este un arbust din Familiei Lamiaceae. Tulpina prezintă o înălțime cuprinsă între 25 și 80 cm, este lignificată în porțiunea inferioară. Frunzele sunt pețiolate, opuse, pubescente, cu margine dințată. Frunzele localizate în partea superioară prezintă dimensiuni reduse și formă sesilă. Florile de salvie prezintă o culoare alb-violacee și sunt dispuse în inflorescențe. În scop terapeutic sunt utilizate frunzele salviei (11-15).

Frunzele de salvie contribuie la reglarea problemelor hormonale, ajutând la diminuarea bufeurilor și a transpirației excesive în perioada premenopauzei și menopauzei, reglează activitatea glandelor endocrine, în special a glandei tiroide, a ovarelor, testiculelor și a pancreasului.

Compoziția chimică: frunzele de salvie conțin ulei volatil (până la 3%) format din: α -tujonă (10–60%), β -tujonă (4–36%), camfor (5–20%), 1,8-cineol humulenă, β -cariofilină și viridiflorol. Derivați acidului hidroxicinamic (circa 3,5%) sunt reprezentați de acidul rosmarinic (până la 3,3%), acidul melitric A, sagecumarina, acidul salvianolic K, acidul sagerinic. Diterpenele fenolice includ: acidul carnosic care autooxidizează cu ușurință la carnosol (0,35%) și se degradează în continuare la rosmanol, epirosmanol, 7-metoxi-rosmanol, galdosol. Triterpenele includ: acid ursolic (până la 3,5%), acid oleanolic (până la 0,4%), α -amirină (0,18%), β -amirină (0,10%). Mai sunt prezente flavonoide (1,1%): luteolină, derivați de luteolină, apigenină, derivați de apigenină, polizaharide, alți constituenți: acid p-hidroxibenzoic, acid gentisic, acid siringic, alți acizi, β -sitosterol, stigmasterol (0,001%) (11-15).

3. Materialul vegetal uscat, din partea aeriană de Talpa găștei (*Leonurus cardiaca* L.), Familia Laminaceae

Leonurus cardiaca L. (Talpa-găștei) este o plantă erbacee, ale cărei frunze imită conturul labelor de găscă de unde și denumirea ei populară. Este răspândită atât în Europa, cât și în Asia Centrală și Asia de Sud. Talpa găștei era folosită încă din antichitate în tratarea afecțiunilor cardiace, în ameliorarea durerilor specifice femeilor și în afecțiunile de la nivelul sistemului nervos. Este o plantă medicinală, cunoscută din cele mai vechi timpuri pentru efectele benefice asupra inimii. În scop terapeutic se recoltează partea aeriană a plantei din care se prepară

numeroase remedii pentru buna funcționare a mușchiului inimii, fiind utilizată în afecțiuni cardiovasculare, în tulburări ale somnului, menopauză, în tratarea anxietății etc (11-15).

Materialul vegetal uscat, preparat fitoterapeutic din partea aeriană de **Talpa găștei** (*Leonurus cardiaca* L.) are acțiune sedativă, calmantă asupra sistemului nervos central și vegetativ, relaxantă a fenomenelor de somatizare în disfuncții neuro-vegetative respiratorii (crize de astm, dispnee funcțională), cardio-vasculare (palpitații, tulburări de ritm, precordialgii, de cauză nervoasă), digestive (epigastralgii), tulburări de menopauză și tulburări nevrotice diverse. De asemenea, are acțiune vasodilatatoare, hipotensivă, acțiune relaxantă a musculaturii netede a vaselor de sânge, cardiotonică, antiaritmică, crește tonusul musculaturii uterului, are acțiune cicatrizantă, antiinflamatorie, antiseptică și este eficientă în insomnie (este de 3 ori mai puternică decât valeriana) (11-15).

Ca și compoziție chimică, partea aeriană de **Talpa găștei** conține alcaloizi (stahidrină, leonurină, leonuridină, leonurinină), derivați flavonici (glicozide ale apigenolului, cvercitolului, kemferolului), iridoide (ajugol, ajugozidă), terpenoide (diterpenoide cu schelet labdanic, leopersină E, izoleosibirină, leopersină F, acid ursolic, ulei volatil, rezine), genkwanina, heterozide cardiotonice de tip bufadienolidic, taninuri catehice, heterozide fenolice (4-rutinozida acidului cafeic), glicozide fenilpropanice (lavanduli-foliozidă), acizi organici (acid citric, acid malic), colină. Heterozidele cardiotonice sunt asemănătoare celor din *Scillae bulbosae* dar nu au acțiunea cardiotonică la fel de bine exprimată. (11-15).

4. Materialul vegetal uscat obținut din conurile de Hamei (*Humulus lupulus* L.)

Familia Cannabaceae

Cunoscut sub pseudonimul "aurul verde", hameiul este o plantă perenă, dioică, care poate ajunge la o înălțime de 6-9 metri și poate trăi 12-20 de ani.

Humulus lupulus L. este o plantă agățătoare, din *Familia Cannabaceae*, fiind originară din China, iar în prezent este cunoscută ca plantă spontană în Europa Centrală și cultivată pe scară largă în regiunile temperate (11-15).

În scop terapeutic, materialul vegetal uscat din conurile de hamei – (*Humulus lupulus* L.), folosit cel mai adesea în combinație cu rădăcina de valeriană, este indicat în tratamentul stărilor de nervozitate, tulburările de somn, gastropatiilor nervoase sau în menopauză.

Substanțele estrogenice determină efecte anafrodisiace, conurile de hamei fiind recomandate în nevrozele sexuale la bărbați. De asemenea, s-a demonstrat că **humulonă** are o activitate de inhibare a resorbției osoase, efect util în tratamentul ostoporozei.

Conurile de hamei conțin principii amare rezinoase (15-30% în conurile femele și 50-80% în perii glandulari) constituite din așa numiții α -acizi (**humulona** = acid α -lupulinic = acid lupamaric, la care se adaugă cohumulona, adhumulona, prehumulona și posthumulona) și din β -

acizi (**lupulona** = acid β -lupulinic, precum și adlupulona, posthumulona) cu o structură acilfluoroglucidică. Derivații prenilați ai 1-acilfluoroglucinolului (lupulona, humulona) conferă gustul amar caracteristic al hameiului.

În timpul depozitării și al prelucrării chimice, aceste substanțe amare (de altfel, compuși foarte instabili), ca și alte structuri însoțite, se izomerizează, formând izohumulona sau tricetone cu ciclu pentagonal: humulinona și hulupona.

Prin antrenarea cu vapori de apă a conurilor de hamei se obține un ulei volatil (0,3-1% în plantă; 1-3% în perii glandulari) alcătuit din peste 150 de compuși. Compusul său principal este **humulenul** (α -cariofilen), care alături de alte sescviterpene (farnesen, β -cariofilen) reprezintă aproximativ 90% din totalul uleiului volatil (11-15). Principaliile amare rezonoase și uleiul sunt cunoscute sub denumirea generică de lupulină.

Flavonoidele prezente în conurile de hamei sunt mono- și diglucozide ale kemferolului și cvercitolului (rutozida, astragalina, cvercitrina), calcone isoprenilate (xantohumol) și o flavanonă isoprenilată (isoxantohumol). Totodată, conurile de hamei mai conțin taninuri (2-4%), cantități mici de acizi fenolici (ferulic, clorogenic), aminoacizi, substanțe estrogenice, etc.

5. Drojdia de bere este o ciupercă microscopică unicelulară, saprofită, care se înmulțește prin înmugurire și aparține familiei *Saccharomitaceae*.

Drojdia este de două feluri: cea folosită la panificație - care se prezintă sub forma unor levuri (drojdii) active mai ales între 15 și 20°C și drojdia folosită la fabricarea berii, care se prezintă sub forma unor levuri (drojdii) active îndeosebi la 5 - 6°C. Aceste levuri, mai mult sau mai puțin dezvoltate, conțin elemente nutritive de excepție.

Cele mai bune rezultate în aplicații terapeutice se obțin, însă, cu **drojdia folosită la fabricarea berii**, care se comportă ca o adevărată uzină de medicamente.

De altfel, drojdia de bere produce aproape întreaga gamă de aminoacizi esențiali, vitamine mai ales din grupul complexului B, dar și vitaminele D, H, E, enzime, săruri minerale cu conținut ridicat de potasiu, fier, calciu, magneziu, fosfor (2%), lipide (5-10%), zaharuri, gluten și anumite oligoelemente indispensabile vieții (seleniu, crom).

Trebuie subliniat că, drojdia de bere este un supliment alimentar care poate să acopere carențele de vitamine ale complexului B, deoarece reprezintă o sursă foarte bogată a acestora, unele dintre ele fiind indispensabile pentru buna funcționare a oricărui organ sau sistem din organismul uman.

Drojdia de bere are proprietăți: vitaminizante, antianemice, antidiabetice, remineralizante, antimicrobiene, depurative, calmante.

Datorită acestor proprietăți, drojdia de bere poate fi recomandată în oboseală fizică și psihică, în stări de agitație și iritabilitate, în intoxicații alimentare, diabet, ficat gras, este un bun fortifiant al sistemului nervos, iar în anotimpul rece menține organismul în formă maximă.

Câteva exemple privind importanța consumului de drojdie de bere:

- scade nivelul colesterolului „rău”(LDL) și combate hipertensiunea arterială, doi dintre factorii majori în apariția bolilor de inimă;
- este benefică persoanelor anemice și celor cu probleme de asimilare ale mineralelor, în special, magneziu și calciu;
- favorizează reglarea tulburărilor de coagulare și alte boli ale sângelui;
- are o influență pozitivă în răceli și alte boli infecțioase, iar prin aportul ridicat de vitamine și minerale (în special seleniu) se întărește imunitatea și se scurtează perioada de convalescență; hepatitele virale A, B, C sunt și ele ținute bine sub control cu ajutorul unui tratament similar (studii efectuate timp îndelungat - de peste 20 ani, de doctorul german A. Schrauzer);
- are efect revigorant asupra sistemului nervos, combătând stările depresive și tulburările psihice, precum și ameliorarea unor afecțiuni grave Parkinson și boala Alzheimer.

Pregătirea extractelor vegetale concentrate

Produsele realizate conform invenției au efect complementar, administrarea lor acoperind 24 de ore.

Formula de zi conține un extract apos concentrat, obținut din frunze și flori de Trifoi roșu, extract ce a fost analizat prin HPLC pentru a se determina concentrația de izoflavone.

Procesul de extracție al compușilor bioactivi din frunzele și florile de Trifoi roșu presupune obținerea extractului apos, realizat la reflux în raport plantă : solvent - 1:10. Acesta este concentrat la rotavapor, cu obținerea unui procent de substanță uscată de aproximativ 20% - 25%. Extractul concentrat de Trifoi roșu a fost realizat în vederea cuantificării, printr-o metodă cromatografică (HPLC) a compușilor fitoestrogenici din clasa izoflavonelor: Daidzein, Genistein, Formononetin și Biochanin A, prezenți și în extractul standardizat de Trifoi roșu.

Extractul standardizat de trifoi roșu, cu conținut de izoflavone 8%, s-a înglobat în proporție de 10% în formulele de zi și de noapte pentru a suplimenta conținutul necesar de izoflavone fitoestrogenice, cu rol în atenuarea simptomelor neplăcute ale menopauzei.

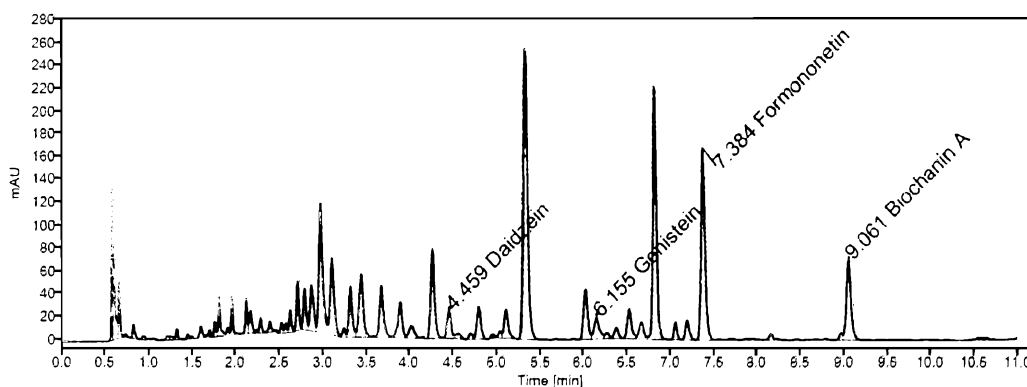
Procesul de extracție al compușilor bioactivi din partea aeriană de Salvie presupune obținerea extractului apos realizat la reflux, pentru conceperea formulei de produs destinat pe timp de noapte. Extractul apos din partea aeriană de Salvie se realizează în raport plantă : solvent - 1:10 și este concentrat apoi la rotavapor, cu obținerea unui procent de substanță uscată de

aproximativ 15% - 20%. Extractul concentrat de Salvie a fost realizat în vederea cuantificării, printr-o metodă cromatografică (HPLC) a compușilor fitoestrogenici și a celor cu efect antioxidant.

Cele două formule de zi și de noapte conțin extracte apoase concentrate la rotavapor din Trifoi roșu și Salvie. Aceste extracte vor fi înglobate în amestecul granulat ce conține suportul format din plante medicinale și totodată o cantitate de 10% de extract standardizat de Trifoi roșu, cu un conținut de 8% Isoflavone. Această cantitate de extract standardizat se adaugă pentru a suplimenta conținutul de izoflavone prezente în extractul concentrat și în materialul vegetal. Aceste cantități de extract standardizat și extracte concentrate au fost alese în urma cuantificării printr-o metodă cromatografică (HPLC) a compușilor fitoestrogenici de interes (Daidzein, Genistein, Formononetin și Biochanin A), la lungimea de undă $\lambda=255$ nm și a polifenolilor la lungimea de undă $\lambda=320$ nm. Valorile obținute în urma acestor analize, din cromatogramele extractelor vor fi prezentate în continuare.

Prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) s-au evidențiat și cuantificat compușii bioactivi de interes din clasa **Izoflavelor**. Astfel, în extractul din trifoi roșu frunze și flori, cât și din extractul standardizat de trifoi roșu, cu conținut de izoflavone 8%, s-au pus în evidență cantități mari de izoflavone fitoestrogenice: **Daidzein, Genistein, Formononetin și Biochanin A** (16-22). Aceste extracte se dovedesc a fi valoroase în mod special prin conținutul de fitoestrogeni, indentificați prin analiza cromatografică, compușii activi de interes din clasa Isoflavelor.

Cromatograma. Trifoi roșu din frunzele și florile din cultura proprie Hofigal

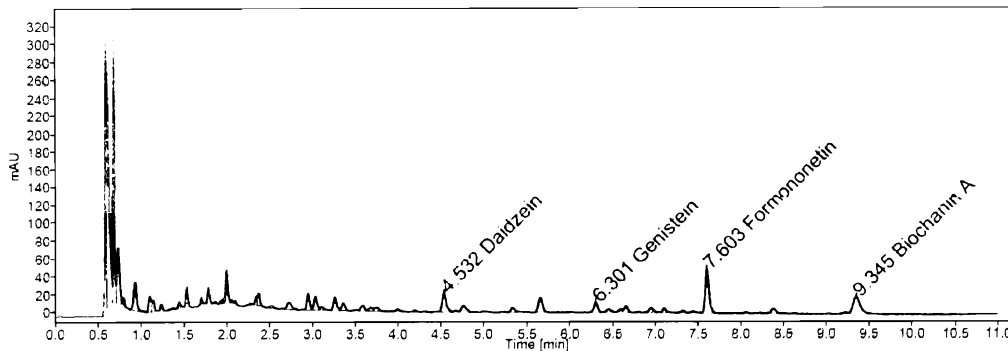


Cromatograma obținută prin dozarea extractului metanolic din frunzele și florile de Trifoi roșu prin determinarea izoflavelor, la lungimea de undă $\lambda=255$ nm

Pentru analiza cromatografică HPLC a fost adaptată din literatură o metodă pentru determinarea izoflavelor, la lungimea de undă $\lambda=255$ nm. Această metodă a fost realizată în urma unei extracții metanolice din frunzele și florile de trifoi roșu fiind puși în evidență următorii

compuși activi: Daidzein, Genistein, Formononetin și Biochanin A, având o concentrație totală de 0.13%.

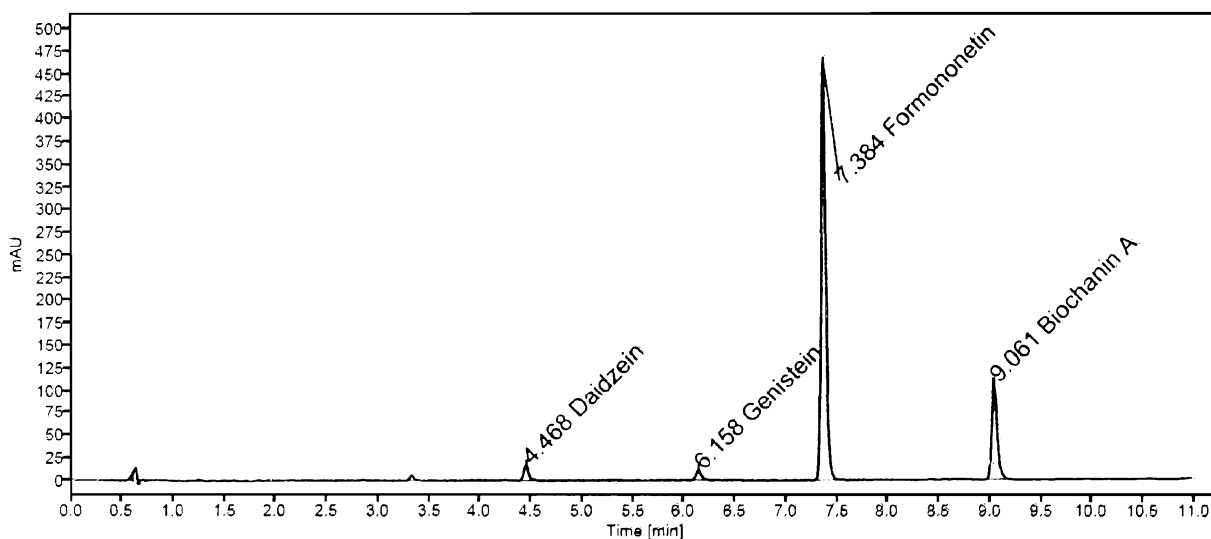
Cromatograma. Extract apos de Trifoi roșu concentrat la rotavapor



Cromatograma obținută prin dozarea extractului apos concentrat la rotavapor din frunzele și florile de Trifoi roșu prin determinarea izoflavonelor, la lungimea de unda $\lambda=255$ nm

Pentru analiza cromatografică HPLC, obținută în urma analizării extracției în metanol 80% din extractul apos concentrat la rotavapor, se observă identificarea compușilor bioactivi de interes: *Daidzein*, *Genistein*, *Formononetin* și *Biochanin A*, fiind detectați la lungimea de undă $\lambda=255$ nm. În cromatograma extractului apos din frunzele și florile de Trifoi roșu, se răgăsesc cei patru compuși principali de interes din clasa izoflavonelor, aceștia însumând o concentrație totală de 0,44g%.

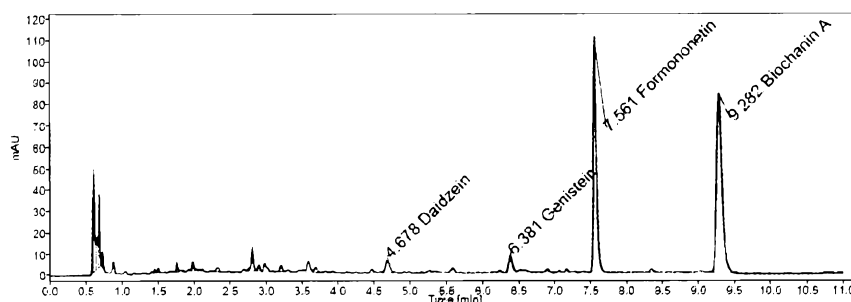
Cromatograma extractului standardizat de Trifoi roșu, cu izoflavone 8%.



Cromatograma obținută prin dozarea extractului standardizat 8% de Trifoi roșu prin determinarea izoflavonelor, la lungimea de unda $\lambda=255$ nm

Prin analiza cromatografică la lungimea de undă 255 nm, realizată în urma extracției metanolice din extractul standardizat de trifoi roșu, cu isoflavone 8%, se regăsesc cei patru compuși principali de interes din clasa izoflavonelor, aceștia însumând o concentrație totală de 7,4%.

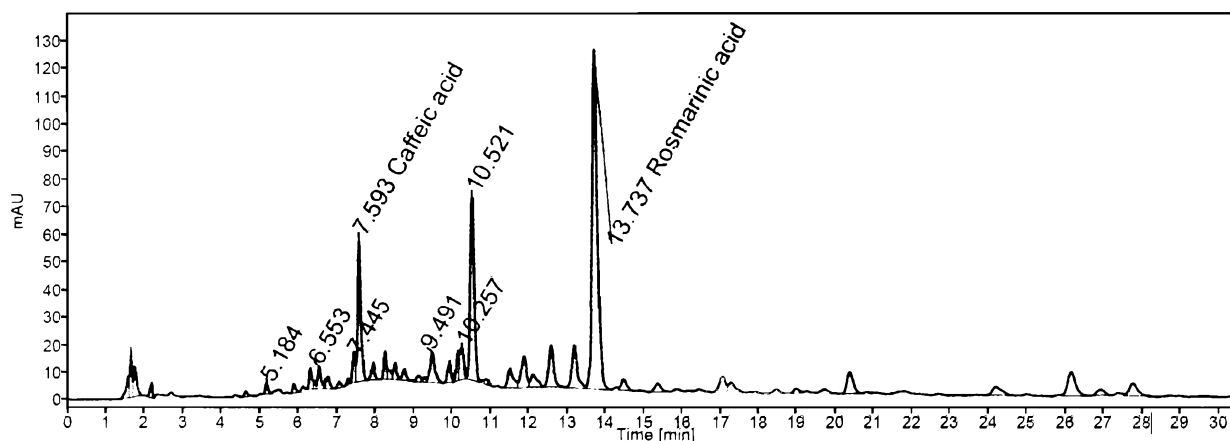
Cromatograma formulă destinat pe timp de zi pe suport de extract apos de Trifoi roșu



Cromatograma obținută prin dozarea formulei de de zi pe suport de extract apos concentrat la rotavapor de Trifoi roșu prin determinarea izoflavonelor, la lungimea de unda $\lambda=255$ nm

Prin analiza cromatografică la lungimea de undă 255 nm, realizată în urma extracției metanolice din produsul destinat pe timp de zi, se regăsesc cei patru compuși principali de interes din clasa izoflavonelor, aceștia însumând o concentrație totală de 0,87%.

Cromatograma formulei de noapte pe suport de extract apos de Salvie



Cromatograma obținută prin dozarea formulei bioprodusului destinat pe timp de noapte pe suport de extract apos concentrat la rotavaporator de Salvie prin determinarea polifenolilor, la lungimea de unda $\lambda=320$ nm

Prin analiza cromatografică la lungimea de undă $\lambda=320$ nm, realizată în urma extracției metanolice din bioprodusul destinat pe timp de noapte, se regăsesc cei trei compuși principali de interes din clasa polifenolilor, aceștia însumând o concentrație totală de 0,199%.

Extractele concentrate la rotavapor, obținute în prima etapă sunt pulverizate peste amestecul de materiale vegetale folosite ca suport pentru obținerea formulilor de zi și noapte, iar în cea de a doua etapă obținându-se în același timp o omogenizare uniformă și uscarea formulilor în condiții optime. După ce amestecurile granulate ale formulilor au fost uscate în condiții optime, se adaugă excipienții de condiționare, în cantitățile necesare conform rețetei și se omogenizează timp de 20 – 30 min.

După ce amestecul granulat a fost omogenizat, se uniformizează dimensiunea particulelor rezultate prin site de inox conform specificațiilor de lucru. Amestecul granulat al produsului se supune apoi unei analize riguroase pentru a se stabili dacă formula este corespunzătoare calitativ și apoi se supune încapsulării, blisterizării și ambalării.

Evidențierea bio-siguranței și a eficacității biologice (activitatea estrogenică) a produselor conform invenției s-a realizat prin studii *in vitro* la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale “Victor Babeș”.

Experimentele de viabilitatea celulară, proliferare și stabilirea potențialului citotoxic al extractelor de plante serarate și a formulilor de zi și de noapte s-au realizat pe linia celulară umană de glandă mamară normală, imortalizată, standardizată (ATCC MCF-12A). Creșterea și propagarea culturii de celule MCF-12A s-a realizat conform instrucțiunilor ATCC. Viabilitatea/proliferarea celulară a fost evaluată prin testul MTS (standard ISO 10993). Experimentele au fost repetate de trei ori, s-a lucrat de fiecare dată cu probele și controalele în triplicat, iar timpii de tratament au fost 48 și 72 de ore. Extractele din plante, atât cele realizate în apă, cât și cele hidroalcoolice nu au prezentat citotoxicitate pe intervalul de concentrații de 0,1-3,33 mg/ml, respectiv 0,1-1,0 mg/ml, pentru ambii timpi de tratament testați. Celulele tratate au avut o viabilitate celulară de 80-100% raportată la viabilitatea celulelor control, netratate.

Formulele de zi și de noapte ale suplimentului alimentar au fost testate prin aceeași metodă, și nu au prezentat citotoxicitate pe intervalul de concentrație de 0,1-3,33 mg/ml, la 48 și 72 de ore de tratament, viabilitatea celulelor fiind cuprinsă între 85-100%, raportată la celulele control, netratate.

Formulele de zi și de noapte au efect de stimulare a proliferarea celulelor umane, normale de glandă mamară. Din monitorizarea în timp real a proliferării celulelor ATCC-MCF12A, folosind platforma xCELLigence, se observă stimularea proliferării celulelor tratate cu formula de zi, sau cu formula de noapte, la o concentrație de 1,0 mg/ml (figura 1).

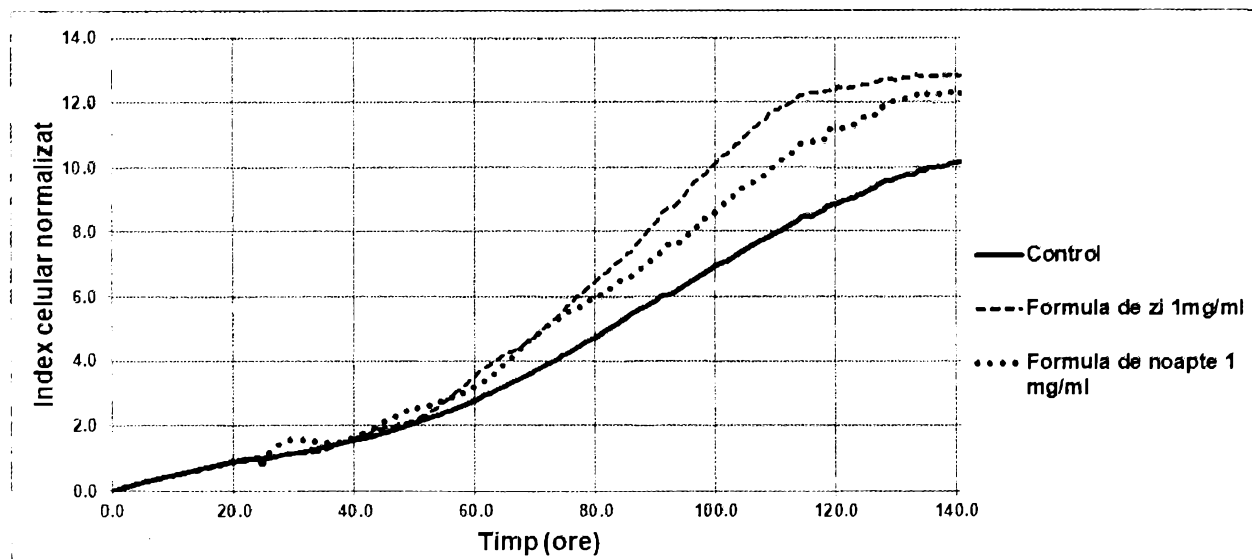


Figura 1. Curba de proliferare a celulelor normale de glandă mamară (MCF-12A) la tratamentul cu formulele de zi și de noapte

Formulele de zi și de noapte prezintă activitate estrogenică

Formulele de zi și de noapte au fost testate in vitro, pentru evaluarea efectului estrogenic folosind ca metodă evaluarea proliferării celulelor de adenocarcinom de sân (ATCC-MCF7) tratate cu soluțiile de formule de zi și de noapte la diferite concentrații non-toxice, în prezența sau în absența unui inhibitor al receptorilor estrogen (ICI 182,780), metodă descrisă de Soto și colaboratorii (23).

Ambele formule, de zi de noapte, au prezentat activitate estrogenică pe intervalul de concentrații de 0,1-1,0 mg/ml, fiind capabile să stimuleze proliferarea celulelor MCF-7 în absența inhibitorului de receptori de estrogen (figura 2). În prezența compusului ICI 182,780 care se leagă la receptorii de estrogen $ER\alpha$ și $ER\beta$, formulele de zi și de noapte nu mai pot interacționa cu receptorii de estrogen și nu mai pot stimula proliferarea celulară. Prin această testare s-a pus în evidență efectul estrogenic pe care formulele de zi și de noapte, testate, îl au pe celulele MCF-7, care exprimă ambii receptori de estrogen $ER\alpha$ și $ER\beta$.

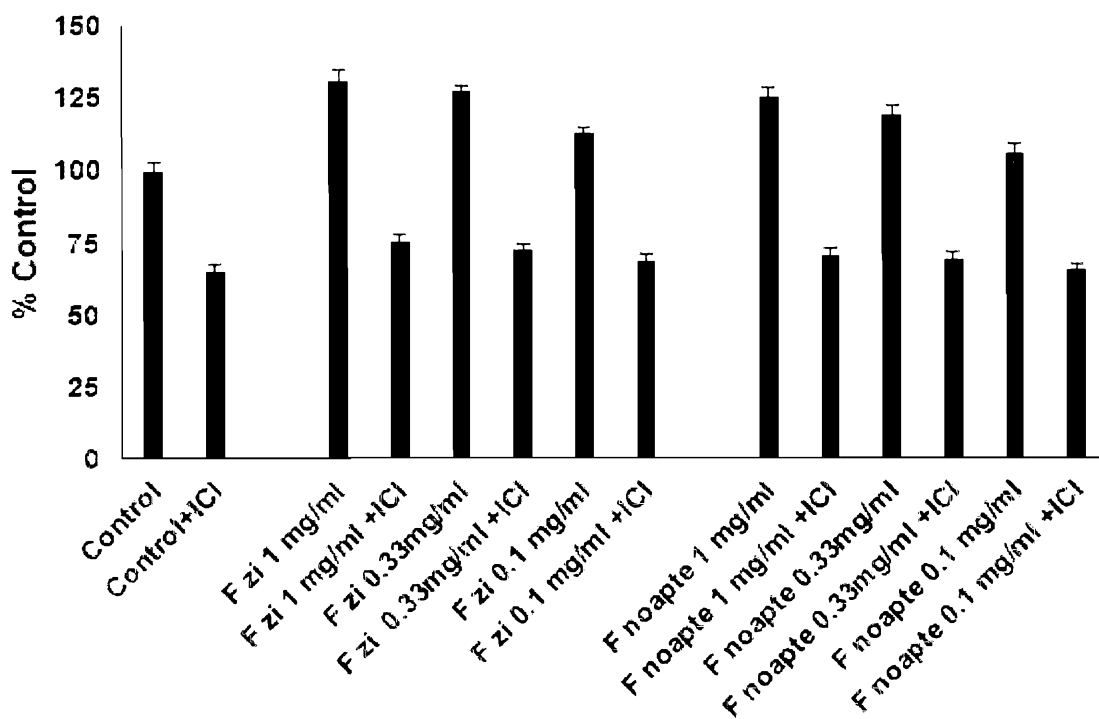


Figura 2. Efectul tratamentului cu formulele de zi și de noapte în absența și în prezența inhibitorului estrogenic ICI182,780, asupra proliferației celulelor MCF-7

Se dau în continuare exemple de aplicare a invenției.

Exemplul 1

Formula de administrat pe timp de zi

Într-un granulator se introduc 24,00 g frunze și flori de Trifoi roșu, uscate și măcinate în condiții menajate la 35 – 40°C, 9,50 g extract standardizat de Trifoi roșu cu un conținut de isoflavone de 8%, 26,50 g parte aeriană de Salvie, uscată și măcinată în condiții menajate la 35 – 40°C și 28,00 g parte aeriană de Talpa găștei. Acest amestec se omogenizează și se folosește ca suport pentru extractul lichid concentrat.

Se realizează extractul apos din frunze și flori de Trifoi roșu.

Aproximativ 100 g de frunze și flori de Trifoi roșu, uscate și măcinate se cântăresc într-un balon cu fund plat peste care se adaugă 900 mL apă. Se refluxează timp de 30 minute. Se lasă la decantat și răcit până la o temperatură de 20-25°C, se filtrează extractul prin hârtie de filtru Whatman. Se măsoară cu un cilindru gradat cantitatea de lichid obținută, aproximativ 600 – 700 mL. Extractul se concentrează la evaporatorul rotativ, sub vid, la o temperatură de 50°C, timp de 2-4 ore, până când se obține o masă de extract concentrat de aproximativ 60 - 70 g.

Extractul concentrat se pulverizează peste masa solidă obținută anterior la granulator. Plantele umectate se introduc într-un uscător, la temperatura de 35-40°C, timp de 3-4 ore.

După uscare, amestecul se macină până la o granulație semifină, de 200 μm (60 mesh) și se omogenizează timp de 30 de minute. După terminarea timpului de omogenizare și uscare a amestecului rezultat, acesta se completează cu excipienți de condiționare, 0,75 g acetat de tocoferol (conservant) și 0,75 g carbonat de calciu (antiaglomerant).

Amestecul final granulat și omogenizat se încapsulează, se blisterizează și se ambalează.

Exemplul 2

Formula de administrat pe timp de noapte

Într-un granulator se introduc plantele uscate și măcinate în condiții menajate la 35 – 40°C, și anume: 18,75 g parte aeriană de Salvie, 27,50 g frunze și flori de Trifoi roșu, 9,50 g extract standardizat de Trifoi roșu, cu un conținut de isoflavone de 8%, 23,25 g conuri de Hamei, uscate și măcinate de asemenea, în condiții menajate la 35 – 40°C. Acest amestec se omogenizează și se folosește ca suport pentru extractul lichid concentrat.

Se realizează extractul apos din părțile aeriene de Salvie.

Aproximativ 100 g părți aeriene de Salvie, uscate și măcinate se cântăresc într-un balon cu fund plat peste care se adaugă 900 mL apă. Se refluxează timp de 30 minute. Se lasă la decantat și răcit până la o temperatură de 20-25°C, se filtrează extractul prin hârtie de filtru Whatman. Se măsoară cu un cilindru gradat cantitatea de lichid obținută, aprox. 600 – 700 ml. Extractul se concentrează la evaporatorul rotativ, sub vid, la o temperatură de 50°C, timp de 2-4 ore, până când se obține o masă de extract concentrat de aproximativ 60 - 70 g.

Extractul concentrat se pulverizează peste masa solidă obținută anterior la granulator. Plantele umectate se introduc într-un uscător, la temperatura de 35-40°C, timp de 3-4 ore.

După uscare, amestecul se macină până la o granulație semifină, de 200 μm (60 mesh) și se omogenizează timp de 30 de minute. După terminarea timpului de omogenizare și uscare a amestecului rezultat, acesta se completează cu 3,75 g drojdie de bere și excipienți de condiționare 1,50 g stearat de magneziu (antiaglomerant).

Amestecul final granulat și omogenizat se încapsulează, se blisterizează și se ambalează.

Bibliografie:

1. Webber L, Davies M, Anderson R, Bartlett J, Braat D, Cartwright B, Citkova R, de Muinck Keizer – Schrama S, Hegervorst E, Jansen E, Liao L, Vlasisavljevic V, Zillikens C, Vermeulen N – European Society for Human R, Embryology Guideline Group on POI. ESHRE Guideline: "management of women with premature ovarian insufficiency". Hum Reprod 2016; 31:926–937.
2. Doerge, D. R. & Sheehan, D. M. Goitrogenic and Estrogenic Activity of Soy Isoflavones, Environmental Health Perspectives Supplements, 2002, Vol. 110, No. 3, pp. 349-353, ISSN 1078-0475
3. Metabolic syndrome and the menopause, Risto J Kaaja, First Published March 1, 2008, <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1258/mi.2007.007032>
4. Menopause: A complex and controversial journey, Salam Chalouhi, First Published 2017September 20, <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2053369117711346?icid=int.sj-abstract.similar-articles.1>
5. Medicinal plants in the treatment of women's disorders: Analytical strategies to assure quality, safety and efficacy, Milena Masullo Paola Montoro Angela Mari Cosimo Pizza Sonia Piacente, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Volume 113, 10 September 2015, p. 189-211 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708515001971>
6. Ovarian Aging and Menopause: Current Theories, Hypotheses, and Research Models, Julie M. Wu, Mary B. Zelinski, Donald K. Ingram, First Published December 1, 2005, <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/153537020523001106>
7. Kao YC, Zhou C, Sherman M, Laughton CA, Chen S. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. Environ Health Perspect. 1998;106(2):85–92.
8. Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. Environ Health Perspect. 1995 Oct;103 Suppl 7(Suppl 7):113-22. doi: 10.1289/ehp.95103s7113.
9. Kao YC, Zhou C, Sherman M, Laughton CA, Chen S. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. Environ Health Perspect. 1998;106(2):85–92
10. Doerge, D. R. & Sheehan, D. M. Goitrogenic and Estrogenic Activity of Soy Isoflavones, Environmental Health Perspectives Supplements, 2002, Vol. 110, No. 3, pp. 349–353, ISSN 1078–0475.
11. Bojor O. *Ghidul plantelor medicinale și aromatice de la A la Z*, Editura Fiat Lux, București, 2003, pag. 219-220.
12. Arash Khorasani Esmaeili, Rosna Mat Taha, Sadegh Mohajer, and Behrooz Banisalam: "Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Content of Various Solvent Extracts from In Vivo and In Vitro Grown Trifolium pratense L. (Red Clover)", Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2015, Article ID 643285, pp. 1-11 <http://dx.doi.org/10.1155/2015/643285>
13. Skoufogianni E., Solomou A.D., Kamperllari F. and Danalatos N. G. „Ecology Cultivation, Composition and Utilization of Salvia Officinalis L. In Greece: A Review, Global Advanced Research Journal of Agricultural Science (ISSN: 2315 – 5094), vol. 6 (12), 2017, pp. 449 – 455.
14. Qi J., Hong Z.Y., Xin H., Zhu Y.Z. „Neuroprotective effects of leonurine on ischemia/reperfusion-induced mitochondrial dysfunctions in rat cerebral cortex”. Biol Pharm Bull, 2010, 33(12): 1958-1964.
15. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) Assessment report on Humulus lupulus L., flos Langezaal CR, Chandra A, Scheffer JJC. Antimicrobial screening of essential oils and extracts of some Humulus lupulus L. cultivars. Pharmazeutisch Weekblad (Scientific Edition), 1992, 14:353–356.

16. Jun-ming SUN, Bao-li SUN, Fen-xia HAN, Shu-rong YAN, Hua YANG, Kikuchi Akio, Rapid HPLC Method for Determination of 12 Isoflavone Components in Soybean Seeds, *Agricultural Sciences in China*, Volume 10, Issue 1, 2011, 70-77.
17. Chen, Qinhua & Li, Peng & Li, Bing & Xiulou, & Zhu, Jun & Chen, Fuchao, Simultaneous Determination of Formononetin, Biochanin A Daidzen and Genistein in *Trifolium pratense* (Red Clover) by HPLC, *LC GC Europe*, 23, 2010.
18. José L. Peñalvo, Tarja Nurmi, Herman Adlercreutz, A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products, *Food Chemistry*, Volume 87, Issue 2, 2004, 297-305.
19. Ramos, Grazielle & Dias, Paula & Morais, Cláudia & Fröhlich, Pedro & Dall'Agnol, Miguel & Zuanazzi, José, LC Determination of Four Isoflavone Aglycones in Red Clover (*Trifolium pratense* L.), *Chromatographia*, 67, 2008, 125-129.
20. Liselotte Krenn, Iris Unterrieder, Renate Rupprechter, Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, Volume 777, Issues 1–2, 2002, 123-128.
21. Hsieh, H. & Kao, Tsai Hua & Chen, Bing-Huei, A Fast HPLC Method for Analysis of Isoflavones in Soybean, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies - J LIQ CHROMATOGR RELAT TECHNO*, 27, 2005, 315-324.
22. Daud, Adawiah & Sulistyarti, Hermin & Retnowati, Rurini & Ginting, Erliana, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method for Determination of Isoflavones Content in Shade-Tolerant Soybean Dena I, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 546, 2019, 032004.
23. Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect.* 1995 Oct;103 Suppl 7(Suppl 7):113-22. doi: 10.1289/ehp.95103s7113.

REVEDICĂRI

1. Produs pentru administrare pe timp de zi, pe bază de plante cu rol estrogenic și benefic în perioada menopauzei, **caracterizat prin aceea că**, este constituit din: extract concentrat din frunze și flori de Trifoi roșu 60....70 g, pulbere din frunze și flori de Trifoi roșu 20.....25 g, extract standardizat de Trifoi roșu (cu un conținut de izoflavone 8%) 8.....12 g, pulbere din partea aeriană de Salvie 20.....30 g, pulbere din partea aeriană de Talpa găștei 25.....30 g și excipienți admiși în industria farmaceutică, fiind condiționat sub formă de capsule.

2. Produs pentru administrare pe timp de noapte, pe bază de plante cu rol estrogenic și benefic în perioada menopauzei, **caracterizat prin aceea că**, este constituit din: extract concentrat din parte aeriană de Salvie 15....25 g, pulbere din partea aeriană de Salvie 15....20 g, pulbere din flori și frunze de Trifoi roșu 25.....30 g, extract standardizat de Trifoi roșu (cu un conținut de izoflavone 8%) 8.....12 g, pulbere din conuri de Hamei 15.....25 g, pulbere de drojdie de bere 3....5 g și excipienți admiși în industria farmaceutică, fiind condiționat sub formă de capsule.

3. Procedeu de preparare a produsului definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, peste plantele uscate și măcinate, respectiv frunze și flori de Trifoi roșu, parte aeriană de Salvie, parte aeriană de Talpa găștei și extract standardizat de Trifoi roșu, se pulverizează extract concentrat de Trifoi roșu iar amestecul obținut se usucă și se omogenizează iar pulberea rezultată se amestecă cu acetat de tocoferol și carbonat de calciu și se condiționează sub formă de capsule.

4. Procedeu de preparare a produsului definit în revendicarea 2, **caracterizat prin aceea că**, peste plantele uscate și măcinate, respectiv parte aeriană de Salvie, frunze și flori de Trifoi roșu, conuri de Hamei și extract standardizat de Trifoi roșu, se pulverizează extract concentrat de Salvie iar amestecul obținut se usucă și se omogenizează iar pulberea rezultată se amestecă cu drojdie de bere și stearat de magneziu și se condiționează sub formă de capsule.

5. Procedeu de stabilire a siguranței produșilor definiți la revendicările 1 și 2, **caracterizat prin aceea că**, evaluează prin metode in vitro bio-siguranța produșilor.

6. Procedeu de stabilire a eficacității biologice a produșilor definiți la revendicările 1 și 2, **caracterizat prin aceea că**, evaluează activitatea estrogenică a produșilor.