

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902067124A1

Publication Date

20140110

Applicant

ARVURE PHARMA SRL

Title

ESTRATTO DI SEDUM CAERULEUM PER USO TERAPEUTICO E/O
COSMETICO

Descrizione della domanda di brevetto per invenzione industriale avente per titolo " Estratto di *Sedum caeruleum* per uso terapeutico e/o cosmetico" a nome di ARVURE PHARMA SRL con sede Loc. Capannaccia Snc, 07020 Palau (OT)

La presente invenzione riguarda un estratto di *Sedum caeruleum* ed il suo uso terapeutico e/o cosmetico.

La presente invenzione riguarda inoltre le frazioni isolate da *Sedum caeruleum*, quali una frazione polisaccaridica e una frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi.

In particolare, detta frazione polisaccaridica può essere utilizzata nel processo di riparazione tissutale (*Wound Healing*) e con la stessa finalità può essere impiegata detta frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi che presenta un'importante azione antiradicalica che la rende interessante nel trattamento cosmetico del *photoaging*.

STATO DELL'ARTE

La dettagliata fisiopatologia delle ferite è stata compresa in maniera approfondita solo successivamente all'affermazione della teoria del sistema a cascata dei segnali cellulari. La cicatrizzazione consiste in una progressione ordinata di eventi che ristabilisce l'integrità del tessuto danneggiato e previene l'invasione nel tessuto danneggiato da parte di patogeni (Irvin T.T., *Archives of Emergency Medicine* **1985**, 2, 3-10). Questa cascata di eventi inizia dal momento in cui si verifica la ferita e può continuare per un periodo di tempo, la cui durata dipende dall'estensione e dalla gravità della lesione. La guarigione di una ferita è un processo

complesso, regolato da una sequenza estremamente precisa di meccanismi molecolari e biologici e può essere diviso in fasi distinte in cui cellule differenti come piastrine, macrofagi, cellule endoteliali, fibroblasti e cheratinociti, giocano un ruolo chiave.

La progressione degli eventi e la funzione delle cellule in ciascuna fase è regolata da numerosi fattori di crescita e da citochine in grado di regolare la migrazione, la proliferazione, la differenziazione, il metabolismo cellulare e il turnover del collagene; tutte queste molecole possono agire in modo paracrino, autocrino o endocrino (Gillitzer R., *J. Pathol.* **2001**, *194*, 393-394). La cascata di eventi inizia con la coagulazione e il reclutamento di cellule infiammatorie seguita da una fase proliferativa in cui i fibroblasti sono coinvolti nella sintesi e nel rimodellamento della matrice di collagene e i cheratinociti si espandono attraverso la ferita per formare un nuovo strato epiteliale, seguito da angiogenesi.

La formazione di nuovi vasi sanguigni crea una strada per la consegna di ossigeno e nutrienti, oltre che un condotto per i componenti responsabili dell'infiammazione. La fase successiva è quella di riassorbimento della ferita e la completa cicatrizzazione. La proteina principalmente coinvolta nella prima fase della riparazione tissutale trovata nei tessuti dei mammiferi è il collagene di tipo 1, che conferisce resistenza meccanica alla pelle, alle ossa e ai tendini. Un danno lesivo determina un aumento della produzione di collagene e la sua sintesi ritorna a livelli di normalità dopo 3-6 mesi dall'insulto lesivo. La degradazione del collagene richiede specifici enzimi noti come collagenasi che appartengono alla famiglia delle metalloproteasi della matrice (MMP) e sono prodotti da macrofagi, fibroblasti e

cheratinociti. Questi enzimi, sintetizzati in risposta a vari stimoli quali quelli di citochine, fattori di crescita, ormoni, trasformazione cellulare e stress di tipo ossidativo, sono espressi generalmente come zimogeni inattivi che necessitano di attivazione, la quale si realizza attraverso l'azione di proteasi plasmatiche, tissutali e di proteasi di batteri opportunisti (Nagase H. et al., *Cardiovascular Research* **2006**, *69*, 562-573). Le MMP sono poi inattivate da regolatori endogeni quali TIMP (tissue inhibitor metalloproteinases) o da parte di proteine plasmatiche come l' α -2 macroglobulina. Le metalloproteasi della matrice acquistano particolare importanza nella cute durante il processo di cicatrizzazione e riepitelizzazione delle ferite; infatti i cheratinociti migrano verso la regione lesa grazie alla presenza di collagenasi che degradano le membrane basali e che sono anche importanti per la produzione e il rimodellamento del tessuto di granulazione cutaneo (Agren MS et al., *Exp. Dermatol.* **2001**, *10*, 337-348).

Il problema clinico della cicatrizzazione è di particolare rilevanza e comporta elevati livelli di morbilità e mortalità. Il problema più noto associato al danno tissutale è l'esposizione ad agenti patogeni che possono colonizzare la zona e provocare infezioni. Inoltre il progresso del danno tissutale è dovuto all'innescò di una rilevante risposta infiammatoria che provoca il rilascio di numerosi mediatori dell'infiammazione e l'accumulo di leucociti neutrofili che conduce ad una eccessiva produzione di radicali liberi che danneggiano ulteriormente il tessuto attraverso la perossidazione dei lipidi di membrana.

La corretta cascata di eventi e modulazione dei mediatori consente perciò di

ottenere una adeguata riparazione del tessuto lesionato.

Le sostanze in terapia devono tener conto dei meccanismi fisiologici della riparazione dei tessuti e l'obiettivo è quello di accelerare i processi di vitalità cellulare e di neoformazione di tessuto modulando i mediatori coinvolti ed eliminando il problema del contagio microbico.

Ad oggi, per prevenire o contrastare le eventuali infezioni che potrebbero sovrapporsi alle lesioni trattate, le sostanze utilizzate in terapia locale per la riparazione tissutale, vengono spesso associate ad un trattamento antibiotico.

Il suddetto trattamento antibiotico può essere somministrato per via orale oppure direttamente applicato sulla ferita.

E' tuttavia ben noto che la somministrazione di prodotti ad attività antimicrobica è frequentemente collegata ad effetti collaterali che ne impediscono l'uso prolungato, come per esempio, reazione allergica, irritazione, senso di bruciore.

In alternativa alla medicina tradizionale, per evitare l'insorgenza di effetti collaterali indesiderati, si può ricorrere alla fitoterapia, ovvero all'utilizzo di piante o estratti di piante per il trattamento delle malattie.

Alcune piante sono note per il loro effetto cicatrizzante ma al momento, non sembrano essere descritti estratti di piante efficaci nel processo di riparazione tissutale.

E' quindi sentita l'esigenza di un trattamento alternativo per le ferite cutanee, che fa uso di ingredienti non tossici e di facile utilizzo.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1: Processo di estrazione di *Sedum caeruleum*

Figura 2: Dosaggio di IL-6 su PBMC umani

DESCRIZIONE

E' stato ora sorprendentemente trovato che un estratto di *Sedum caeruleum* può essere utilizzato come agente terapeutico e/o come agente cosmetico.

Sedum caeruleum, anche nota come borragina azzurra, è una pianta endemica sarda, della famiglia delle *Crassulaceae*. Il cataplasma delle sue parti aeree viene usato nella medicina popolare dell'Ogliastra (Sardegna centro-orientale) nella cura delle ustioni (C. Sanna et al. *Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Mem., Serie B*, 2006, **113**, p 73-82) e nel trattamento di patologie riguardanti l'apparato muscolo-scheletrico (C. Foddis et al. *Rendiconti Seminario Facoltà Scienze Università Cagliari*, 2006, **76**, Fasc. 1-2).

Oggetto della presente invenzione è un estratto di *Sedum caeruleum* per uso terapeutico e/o cosmetico.

Secondo la Farmacopea Ufficiale in vigore (F.U.I. XII ed., 2008), un estratto è una “*preparazione concentrata, liquida, solida o di consistenza intermedia, ottenuta generalmente da materie prime vegetali o animali essiccate*”.

Si distinguono le preparazioni ottenute a partire dalla pianta fresca quali i succhi, la tintura madre, il macerato glicerinato, gli oli essenziali o essenze, e le preparazioni ottenute partendo dalla pianta essiccata quali l'infuso, il decotto, la tisana, la polvere, l'estratto fluido o l'estratto secco.

Secondo la presente invenzione, un estratto adatto è scelto tra il succo, un estratto fluido o un estratto secco.

In particolare, il succo della pianta viene ottenuto mediante estrazione meccanica, quale spremitura della pianta o centrifugazione, dopo essere

stata sottoposta a frantumazione.

L'estratto fluido viene preparato per macerazione della pianta secca in un solvente. Esempi di estratti fluidi sono estratti idroalcolici, alcolici, o glicerici.

L'estratto secco si prepara dall'estratto fluido, facendone evaporare opportunamente il solvente.

L'estratto preferito della presente invenzione può pertanto essere ottenuto mediante diversi processi di preparazione, comprendenti passaggi di estrazione convenzionali, ben noti all'esperto del settore.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è pertanto un processo di preparazione di un estratto di *Sedum caeruleum*, comprendente i seguenti passaggi:

- a) centrifugazione della parte aerea di *Sedum caeruleum*, con conseguente ottenimento di un succo;
- b) filtrazione del succo così ottenuto, con conseguente ottenimento di un succo filtrato;
- c) concentrazione del succo filtrato così ottenuto, a dare un estratto concentrato.

L'estratto concentrato così ottenuto presenta un elevato titolo di polifenoli e flavonoidi, principalmente glicosidi di campferolo e quercetina.

Con il termine "elevato titolo" di polifenoli, secondo la presente invenzione, si intende un titolo in peso superiore allo 0,3%, preferibilmente superiore allo 0,5%, più preferibilmente superiore allo 0,7%, rispetto al peso totale dell'estratto.

Secondo una forma di realizzazione della presente invenzione, la parte

aerea di *Sedum caeruleum* viene finemente sminuzzata in mulino e poi sottoposta ad estrazione meccanica, quale la centrifugazione, con conseguente ottenimento di un succo.

Tale operazione viene preferibilmente effettuata ad una temperatura compresa tra 10 °C e 20 °C, per una durata di tempo compresa tra 3 e 5 minuti, ovvero fino ad avere una quantità di liquido centrifugato costante, senza solidi in sospensione.

Per poter eliminare i residui di pianta rimasti dopo la centrifugazione, il succo di *Sedum caeruleum* ottenuto nel passaggio a), viene sottoposto ad una filtrazione a pieghe su carta. Tale operazione viene preferibilmente effettuata ad una temperatura compresa tra 10 °C e 20 °C. La resa del succo rispetto alla droga di partenza è circa il 20-25%, preferibilmente superiore al 20%.

Con il termine “droga”, ovvero la parte della pianta utilizzata ai fini terapeutici, secondo la presente invenzione si intende la parte epigea di *Sedum caeruleum*.

Detto succo filtrato, così ottenuto, viene in seguito concentrato per fornire una frazione liquida ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi.

I termini “estratto concentrato” e “frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi” sono equivalenti.

Secondo una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, il succo filtrato viene concentrato fino a raggiungere il titolo in polifenoli totali del 6%, preferibilmente fino a raggiungere il 7%, rispetto al peso totale del succo filtrato iniziale.

La concentrazione viene effettuata preferibilmente ad una temperatura

compresa tra 45 °C e 50 °C, per una durata di tempo compresa tra 1 ora e 3 ore per litro.

Detta frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi comprende un rapporto relativo in peso tra polifenoli e flavonoidi caratteristico compreso tra 1,5 e 2,5.

Essa può anche comprendere quantità inferiori all'1,5% in peso, di ulteriori componenti, quali catechine.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è quindi un estratto di *Sedum caeruleum*, ovvero una frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi, ottenibile mediante il processo descritto sopra.

Un altro oggetto della presente invenzione è un processo per la preparazione di un estratto di *Sedum caeruleum*, comprendente i seguenti passaggi:

- a) centrifugazione della parte aerea di *Sedum caeruleum*, con conseguente ottenimento di un succo;
- b) estrazione con acqua del succo così ottenuto, fornendo una soluzione acquosa dell'estratto;
- c) precipitazione di detta soluzione acquosa con un solvente organico polare;
- d) separazione della frazione isolata.

L'estratto così ottenuto è una frazione polisaccaridica, ovvero contenente una quantità di polisaccaridi, superiore al 90% in peso, più preferibilmente superiore a 99%, rispetto al peso totale dell'estratto.

Come nel primo processo sopra descritto, la parte aerea della pianta viene prima finemente sminuzzata in mulino e poi sottoposto ad estrazione

meccanica, mediante centrifuga o spremitrice meccanica.

Il succo così ottenuto viene messo a contatto con acqua distillata e la soluzione, in agitazione, viene portata ad una temperatura compresa tra 80°C e 100°C, più preferibilmente compresa tra 85 °C e 95 °C. Tale operazione di estrazione ha una durata preferibilmente compresa tra 3 e 6 ore, più preferibilmente di 4 ore.

Il rapporto in volume tra la quantità di acqua utilizzata per detta estrazione e la quantità di succo impiegata è compreso tra 5:1 e 20:1, preferibilmente è di circa 10:1, rispetto al volume del succo. Il surnatante viene poi separato, mediante tecniche convenzionali ben note all'esperto del ramo, quali per esempio la centrifugazione oppure la filtrazione, la decantazione.

La soluzione acquosa ottenuta, viene preferibilmente lasciata tutta la notte ad una temperatura compresa tra 1 °C e 10 °C, più preferibilmente tra 2 °C e 5 °C.

Si aggiunge un solvente organico polare a detta soluzione acquosa, avente una temperatura compresa tra 0 °C e -40 °C, più preferibilmente compresa tra -20 °C e -30 °C.

Un solvente organico polare adatto secondo la presente invenzione è un solvente organico polare protico, preferibilmente un solvente alcolico, più preferibilmente etanolo.

Tale operazione di precipitazione viene condotta ad una temperatura compresa tra 1 °C e 10 °C, più preferibilmente tra 2 °C e 5 °C. e ha una durata preferibilmente compresa tra 3 e 6 ore, più preferibilmente di 4 ore.

Il rapporto in volume tra la quantità di solvente organico polare utilizzata per detta precipitazione e la quantità di soluzione acquosa impiegata è

compreso tra 2:1 e 5:1, preferibilmente è di circa 3:1, rispetto al volume di soluzione acquosa.

Il precipitato viene separato mediante centrifugazione e viene poi essiccato sotto flusso d'azoto.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è un estratto di *Sedum caeruleum*, ovvero una frazione polisaccaridica, ottenibile mediante il processo sopra descritto.

L'attività biologica delle due frazioni, ovvero della frazione polisaccaridica e della frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi ottenibili mediante uno dei processi della presente invenzione, è stata valutata e viene riportata di seguito nella parte sperimentale.

Come evidenziato nella suddetta parte sperimentale, i principi attivi di *Sedum caeruleum* L., ovvero detta frazione polisaccaridica e detta frazione ad elevato titolo di polifenoli e polisaccaridi della presente invenzione, hanno la capacità di intervenire in molti dei passaggi descritti nel processo di riparazione tissutale.

Il fitocomplesso del succo della specie oggetto di studio, ovvero l'insieme delle sostanze attive e dei coadiuvanti farmacologicamente inerti, diversamente da molti prodotti vegetali, quali estratti di grano o gel di aloe, e semisintetici quali aminoacidi, utilizzati tuttora in terapia, dimostra di possedere attività antimicrobica che impedisce l'insorgenza di infezioni sulla parte lesa. L'attività battericida dello stesso è evidente nei confronti dei principali ceppi batterici Gram + patogeni cutanei come *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Principalmente i polisaccaridi di *Sedum caeruleum* L., ma anche il succo

della pianta, promuovono la riparazione dei tessuti con un meccanismo ancora non del tutto chiarito che sembra prevedere l'induzione della sintesi di collagene e la proliferazione dei fibroblasti.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è pertanto un estratto di *Sedum caeruleum*, per uso nel trattamento delle ferite cutanee, ovvero delle lesioni della cute, delle mucose e dell'epitelio corneale.

Con il termine "lesioni della cute" secondo la presente invenzione, si intendono ustioni, abrasioni, escoriazioni, tagli, ferite superficiali ed affezioni dermatologiche.

Secondo la presente invenzione, detto estratto è preferibilmente il succo, o la frazione polisaccaridica.

Con il termine "trattamento delle ferite cutanee", secondo la presente invenzione, si intende l'accelerazione del processo di cicatrizzazione (*Wound Healing*) della ferita, associata ad un'efficace attività antimicrobica.

Più dettagliatamente indagata invece è l'importantissima modulazione dei mediatori del rimodellamento del tessuto da parte dei principi attivi di *Sedum caeruleum* L.: l'azione si manifesta nella modulazione di interleuchine pro infiammatorie ma anche delle metalloproteasi e del rilascio di NO. Il controllo della risposta infiammatoria è in parte dovuto e si accompagna alla notevole capacità dei polifenoli di *Sedum caeruleum* L. di inibizione dell'iperproduzione di specie radicali che azotate e ossigenate.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è pertanto un estratto di *Sedum caeruleum* per uso come agente antinfiammatorio.

Un estratto adatto secondo la presente invenzione è preferibilmente la

frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi.

L'azione di controllo dei mediatori del rimodellamento tissutale e l'attività antiossidante, rendono i preparati a base di *Sedum caeruleum* L. particolarmente interessanti in campo cosmetico per il mantenimento della salute del derma. In particolare, la frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi trova applicazione nel trattamento cosmetico del fotoinvecchiamento, anche chiamato *photoaging*.

Con il termine "fotoinvecchiamento", si intende il danno cronico e progressivo della cute provocato dall'azione lesiva dei raggi ultravioletti sulle cellule della pelle.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è pertanto un estratto di *Sedum caeruleum*, per uso cosmetico nel trattamento del *photoaging*.

Secondo la presente invenzione, detto estratto è preferibilmente la frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi.

La presente invenzione ha anche per oggetto una composizione essenzialmente costituita da detta frazione polisaccaridica e detta frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi.

Nella suddetta composizione, il rapporto in peso frazione polisaccaridica/frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi è compreso tra 5 e 50, preferibilmente tra 10 e 30, rispetto al peso totale della composizione.

Detta composizione secondo la presente invenzione viene vantaggiosamente utilizzata per il trattamento delle ferite cutanee, ovvero delle lesioni della cute, delle mucose e dell'epitelio corneale.

Secondo la presente invenzione l'estratto e/o detta composizione possono

essere formulati in una qualsiasi forma adatta alla somministrazione topica, preferibilmente come crema, unguento, pomata, soluzione, sospensione, polvere o gel; più preferibilmente, la composizione è in forma di gel o crema.

Inoltre, detto estratto e/o detta composizione secondo la presente invenzione possono essere presenti in forma di soluzione acquosa.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è l'uso oftalmico di detto estratto e/o detta composizione.

PARTE SPERIMENTALE

CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DELLE PREPARAZIONI

DI *SEDUM CAERULEUM* L:

Il succo delle parti epigee di *Sedum caeruleum* L. si presenta come un liquido di color rosso rubino in cui si evidenzia la componente viscosa dei polisaccaridi. Lo screening fitochimico e la spettrofotometria UV-visibile, eseguiti secondo le metodiche riportate di seguito, evidenziano la presenza di due componenti maggioritarie: quella polisaccaridica e quella polifenolica e flavonoidica; quest'ultima comprende acidi fenolici semplici, flavonoidi e tannini.

Un'aliquota del succo è stata disciolta in acqua e portata alla concentrazione di 1 mg/mL. Tramite spettrofotometria UV-visibile tra 210 nm e 750 nm sono stati ottenuti gli spettri dei campioni in soluzione.

Test qualitativi

Si è successivamente proceduto all'analisi qualitativa delle classi di costituenti principali degli estratti mediante semplici test di riconoscimento.

Polifenoli

Per lo screening qualitativo dei polifenoli è stato condotto il saggio di Folin Ciocalteu sotto descritto partendo da una concentrazione di 1 mg/mL. La comparsa della colorazione blu nella miscela di reazione entro 30 minuti indica la presenza di polifenoli.

Flavonoidi

Anche per la verifica della presenza di flavonoidi e composti correlati si è ricorsi ad una reazione cromatica semplice ed efficace, la reazione di Willstatter. Al succo sciolto in metanolo (1 mg/mL) è stato aggiunto un truciolo di magnesio metallico e acido cloridrico concentrato. La comparsa di una intensa colorazione gialla o arancio o rossa indica la presenza di flavonoidi.

Proantocianidine (flavan-3-oli)

L'anello A catechinico in ambiente acido reagisce con aldeide vanillica per formare un addotto rosso con un massimo di assorbimento a 500 nm.

Con questa semplice reazione colorimetrica è stata determinata la presenza di catechine e proantocianidine nei singoli campioni.

Un'aliquota di soluzione acquosa di succo (1 mg/mL) è stata prelevata e addizionata a 1 mL di acido cloridrico 11.5 N e 0,5 mL di soluzione di vanillina in etanolo (1%). Il saggio è positivo per comparsa immediata di colore rosso. Il controllo positivo è stato eseguito con catechina pura.

Alcaloidi

Alla soluzione acquosa di SUC (1 mg/mL) si è aggiunto il reattivo di Dragendorff composto da ioduro di potassio e bismuto. Il saggio è positivo con comparsa di precipitato arancio-rosso.

Sulla stessa soluzione è stato condotto anche il test con l'acido picrico che

precipita in giallo gli alcaloidi (reattivo di Hager).

Per un confronto con dei controlli positivi sono stati eseguiti gli stessi saggi su campioni di boldina pura.

Cumarine

Una soluzione etanolica di succo (1 mg/mL) è stata inserita in un tubo da saggio chiuso con carta impregnata di idrossido di sodio 0,25 mol/L; rivelata con luce ultravioletta, la carta assume colorazione verde in tutta l'area a contatto con l'apertura del tubo in presenza di cumarine. Il controllo positivo è stato fatto con cumarina pura.

Glicosidi triterpenici e steroidei

Per verificare la presenza di glicosidi il saggio effettuato è stato quello di Liebermann – Burchard.

Il succo è stato solubilizzato in cloroformio (massima solubilità 0,1 mg/mL); su 1 mL di tale soluzione è stata versata goccia a goccia una miscela 19:1 di anidride acetica – acido solforico (reattivo di Liebermann – Burchard). Una colorazione blu intensa indica la presenza di glicosidi steroidei mentre una colorazione viola, rossa o porpora indica la presenza di glicosidi triterpenici.

Le ulteriori indagini analitiche sono state condotte con HPLC accoppiato ad un rilevatore a fotodiodi DAD e ad uno Spettrometro di Massa triplo quadrupolo, con sorgente multimode (ESI + APCI) operante in modalità ioni positivi/negativi.

Test quantitativi

Per la quantificazione dei polifenoli totali del succo è stato usato il metodo di Folin Ciocalteau (FC). Il saggio è stato condotto inserendo 0,5 mL di

soluzione acquosa (100 µg/mL) in provette da 10 mL. Il volume è stato portato a 3,0 mL con acqua.

Alla soluzione così ottenuta si sono aggiunti 0,5 mL di reattivo FC pronto all'uso (reattivo diluito 10 volte in metanolo) e si è agitato vigorosamente per 30 secondi; immediatamente dopo si sono aggiunti 1,0 mL di una soluzione di Na₂CO₃ anidro al 20% in acqua distillata (p/p). La miscela così ottenuta è stata lasciata al buio per 120 minuti e successivamente l'assorbanza di ogni soluzione è stata misurata a 700 nm contro bianco (acqua pura).

La retta di taratura è stata realizzata con acido gallico a concentrazioni comprese tra 500 µg/mL e 25 µg/mL.

La concentrazione dei polifenoli nel campione è stata calcolata, come di norma, come mg/g di succo secco, espressi come acido gallico.

Per la determinazione dei flavonoidi totali, è stato deciso di eseguire una titolazione spettrofotometrica dei campioni seguendo la metodica della lettura a 353 nm contro campferolo usato come standard. Il succo è stato solubilizzato in acqua:etanolo 1:1 (0,2 mg/mL) e l'assorbanza letta a 358 nm che è il massimo di assorbimento del campferolo, utilizzato come standard, e su cui è stata costruita una retta di taratura. Tutte le analisi sono state eseguite in triplo. Dai valori di assorbanza e dalla regressione della retta di taratura è possibile determinare i flavonoidi totali espressi come campferolo. Il contenuto di flavan-3-oli negli estratti di *Sedum caeruleum* L. è stato determinato con una reazione spettrofotometrica; infatti la porzione 3-flavan-olica in ambiente acido forma un addotto rosso con l'aldeide vanillica con massimo di assorbimento a 500 nm. Sono stati

aggiunti 0,5 mL del campione (1 mg/mL in acqua) ad 1 mL di HCl 11N, 0,5 mL di una soluzione all'1% di vanillina in etanolo e dopo 20 minuti è stata misurata l'assorbanza a 500 nm, i valori sono stati correlati alla retta di taratura realizzata utilizzando (-)epicatechina pura.

Il succo, preparato a partire da diversi lotti di materiale congelato, contiene non meno dello 0,3% di polifenoli totali calcolati con il metodo colorimetrico di Folin-Ciocalteu.

L'estrazione in acqua calda e la successiva precipitazione con etanolo freddo, permettono di ottenere una frazione grezza contenente i polisaccaridi idrosolubili di *Sedum caeruleum* L. La frazione si presenta bianca caseosa ed è solubile in acqua.

La filtrazione e la concentrazione del succo totale di *Sedum caeruleum* L. permettono di ottenere un liquido rosso scuro limpido, contenente principalmente polifenoli. La concentrazione dovrebbe essere eseguita fintanto che si mantiene la completa stabilità della soluzione; la soluzione concentrata dovrebbe contenere un titolo minimo di polifenoli dell'1%.

PROVE DI EFFICACIA *IN VITRO* SUGLI ESTRATTI

1) Valutazione dell'attività antinfiammatoria

L'attività antinfiammatoria preliminare è stata saggiata mediante dosaggio di citochine proinfiammatorie su colture di linfomonociti (PBMC) umani. In particolare è stata dosata l'interleuchina IL-6 prodotta da PBMC in risposta ad uno stimolo infiammatorio acuto provocato da LPS batterico.

Il test è stato ottimizzato fornendo uno stimolo che non comprometta la vitalità cellulare dei PBMC.

La produzione di IL-6 in condizioni basali da parte dei PBMC è molto

bassa: 10^6 cellule producono meno di 10 pg di questa interleuchina. Viceversa, uno stimolo infiammatorio può far aumentare la produzione di IL-6 anche di due ordini di grandezza. Nella prova sperimentale eseguita, i PBMC sono stati incubati con i vari estratti di *Sedum* in presenza ed in assenza di stimolo indotto da LPS per poter valutare contemporaneamente la modulazione di IL-6 da parte degli estratti e la loro attività antinfiammatoria.

Metodo sperimentale

Il sangue venoso è stato prelevato in provette con EDTA (1,3 mL/50 mL di sangue) per prevenire la coagulazione ed è stato immediatamente utilizzato. Attraverso la separazione del sangue con Histopaque e successivi lavaggi, si recupera e si isola l'anello linfomonocitario e i PBMC sono contati attraverso microscopia su camera citometrica.

In piastre multiwell da 24, in ogni pozzetto è introdotto il mezzo di coltura, RPMI e 10^6 PBMC. Nei diversi pozzetti sono poi state inserite le sostanze in esame in presenza e in assenza di LPS. Il controllo basale è stato valutato su PBMC da soli mentre il controllo positivo è stato valutato su PBMC stimolati con LPS.

Le piastre sono state incubate per 24 ore a 37 °C.

Il dosaggio della IL-6 è stato eseguito sui surnatanti dei pozzetti mediante ELISA non competitivo a sandwich, eseguendo preliminarmente una taratura su 8 punti con IL-6 standard.

È stato utilizzato un kit ELISA commerciale costituito da un anticorpo di bloccaggio, l'anticorpo di cattura, il coniugato in streptavidina e il cromoforo che permette la lettura in assorbanza della concentrazione di IL-

6.

Risultati e discussione

Il dosaggio della IL-6 su PBMC umani mostra che *Sedum caeruleum* L. è in grado di aumentare l'espressione di questo mediatore in situazioni basali, allertando e promuovendo quindi la risposta monocitaria e, allo stesso tempo, di inibire la iperproduzione di IL-6 in condizioni di infiammazione indotta.

Preliminarmente è stato condotto uno studio su singola concentrazione, 200 µg/mL, per mettere in evidenza il diverso apporto delle diverse componenti di *Sedum caeruleum* L..

Come si può evincere dal grafico riportato (vedi Figura 2), sia la frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi (titolata all'1% in polifenoli totali) che quella polisaccaridica aumentano l'espressione di IL-6 in assenza di stimolo, pur mantenendo valori di interleuchina sub tossici (azione immunomodulante). La frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi, rispetto al controllo, aumenta l'espressione di IL-6 di oltre 55 volte, mentre la frazione polisaccaridica di oltre 40.

La frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi appare più attiva nel complesso della modulazione come si vede dalla capacità di questa di inibire significativamente l'espressione di IL-6 in PBMC stimolati (oltre il 30%). Alla concentrazione testata, la frazione polisaccaridica non evidenzia attività inibente del rilascio di IL-6 da parte di PBMC stimolati.

2) Valutazione dell'attività antiossidante/antiradicalica

Per la determinazione della capacità antiradicalica del succo concentrato di *Sedum caeruleum* L. è stato utilizzato il metodo spettrofotometrico con

DPPH.

I meccanismi tramite i quali le sostanze antiossidanti svolgono una attività antiradicalica sul DPPH* sono di due tipi: un meccanismo diretto legato all'allontanamento di atomi di idrogeno ed un meccanismo legato ad un trasferimento protonico.

Tale reazione porta ad una variazione del colore della soluzione, da un rosa intenso al giallo pallido e il risultato è un decremento dell'assorbanza a 515 nm.

Metodo sperimentale

La soluzione di DPPH è stata preparata solubilizzando il reattivo in metanolo alla concentrazione di 1×10^{-4} M.

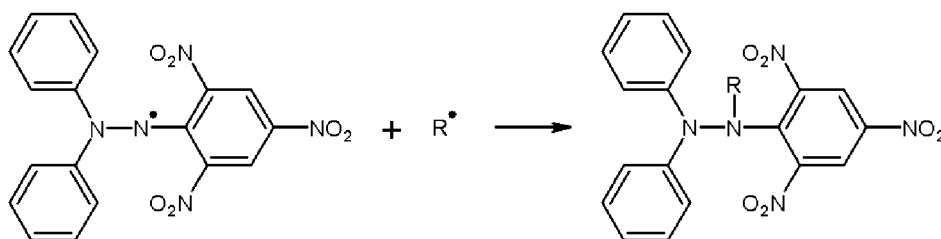
I campioni sono stati solubilizzati in acqua e sono state preparate soluzioni con range di concentrazione iniziale compreso tra 8 mg/mL e 62,5 µg/mL.

In cuvette aventi percorso ottico di 1 cm, sono state poste le soluzioni dei campioni a diverse concentrazioni e la soluzione di DPPH (1:19) e si è lasciato incubare a temperatura ambiente, al buio per 30'. Il controllo positivo è stato realizzato con acqua e DPPH (1:19) e il bianco con sola acqua.

L'inibizione percentuale del DPPH è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\% \text{ inibizione} = (Abs_c - Abs_x) / Abs_c \times 100$$

dove Abs_c è l'assorbimento del controllo positivo e Abs_x l'assorbimento del campione.



Reazione del DPPH con un composto antiossidante

Risultati e discussione

L'attività antiradicalica di *Sedum caeruleum* L. è estremamente significativa e si assiste all'inibizione del radicale DPPH fino a concentrazioni inferiori a 10 µg/mL. La curva dose risposta indica che l'IC₅₀ è inferiore ai 100 µg/mL.

3) Valutazione dell'attività antimicrobica

Metodo sperimentale

Per la valutazione preliminare dell'attività antibatterica il succo concentrato e la frazione polisaccaridica sono stati testati nei confronti di *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (batterioteca CCUG, Goteborg). I ceppi sono stati seminati in terreno solido NBA e tenuti in incubazione a 37 °C per 24 ore; in seguito è stata preparata per ogni ceppo una sospensione batterica in soluzione fisiologica, pari allo 0,5 dello standard turbidimetrico McFarland (soluzione di 0,05 mL di BaCl₂ all'1% e 9,95 mL di H₂SO₄ all'1%) corrispondente approssimativamente ad una sospensione batterica di 1 x 10⁷ UFC/mL.

Per l'inseminazione sono state utilizzate piastre Petri di 60 mm di diametro.

In ciascuna piastra sono stati versati 7 mL di NBA, sciolto e mantenuto a 45

°C per circa 30 minuti.

Dopo solidificazione del terreno, le piastre sono state asciugate in un incubatore non ventilato a 37 °C e quindi trasferite a 4 °C per aumentare la consistenza del terreno.

A destra e a sinistra si leggono i controlli di crescita in assenza di campione.

Diametralmente, in ciascuna piastra, è stata tagliata ed asportata una striscia di terreno larga circa 6 mm. Lo spazio risultante è stato riempito con il terreno NBA contenente i campioni sciolti in NBA a due diverse concentrazioni, 100 mg/mL e 50 mg/mL (una concentrazione per piastra). Il saggio è stato effettuato seminando le sospensioni batteriche lungo linee tra loro parallele, che attraversavano perpendicolarmente la striscia di terreno contenente il campione da esaminare.

La lettura dei risultati è stata fatta dopo incubazione a 37 °C per 48 ore. Il campione è stato considerato dotato di attività antibatterica quando è stata osservata un'assenza di crescita batterica in corrispondenza della striscia contenente il campione.

Risultati e discussione

I campioni testati, alla concentrazione di 100 mg/mL e 50 mg/mL, hanno mostrato attività antibatterica nei confronti di *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pyogenes* e alla concentrazione di 100 mg/mL nei confronti di *Staphylococcus aureus*. Questi ceppi batterici sono i patogeni più comuni nel caso di lesioni ai tessuti. Con il test eseguito, si è evidenziata attività su *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* solo alla massima concentrazione testata.

Alla luce di tutti i risultati preliminari ottenuti sugli estratti di *Sedum caeruleum* L. è possibile sottolineare come questi preparati possano trovare applicazione nel *Wound Healing* agendo effettivamente su diversi passaggi della riparazione dei tessuti: la frazione polisaccaridica ha un effetto sulla sintesi del collagene e facilita la proliferazione dei fibroblasti con un effetto meccanico di scorrimento, la frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi presenta un importante effetto antiradicalico e di conseguenza antinfiammatorio.

Entrambe le frazioni posseggono attività peculiari e possono essere utilizzate da sole o in combinazione in varie percentuali anche in aggiunta al succo semplice della pianta che quindi risulterebbe arricchito nei componenti attivi.

C) PROVE *IN VIVO*

Introduzione

Per valutare l'efficacia dell'estratto nel processo di *Wound Healing* dopo trattamenti cosmetici, è stato condotto uno studio che ha previsto l'utilizzo dell'estratto in seguito ad interventi di peeling seguiti da dermoabrasioni.

Con il termine peeling si definisce la tecnica che consiste nell'applicazione di una o più sostanze chimiche, in immediata o ritardata successione, in grado di indurre la distruzione di aree epidermiche e/o di strato del derma ed il successivo processo di rigenerazione tissutale allo scopo di trattare alcune affezioni cutanee e/o risolverne o migliorarne gli aspetti clinico estetici. Il peeling viene utilizzato prevalentemente in ambito clinico-estetico e trova essenzialmente impiego nel trattamento di alcune forme caratterizzate da danno attinico, contribuendo anche ad agire come fattore

di prevenzione delle conseguenze del danno indotto da foto esposizione comprese le lesioni discheratosiche potenzialmente precancerosiche.

L'eventuale successiva dermoabrasione permette di rimuovere lo strato corneo superficiale.

Gli aspetti clinici post - peeling trattati con l'estratto, per agevolare i processi riparativi, sono stati:

- Edema;
- Eritema;
- Vescicolazione;
- Presenza di lesioni crostose;
- Presenza di lesioni desquamative;
- Discromie iper o ipocromiche.

Metodo

In particolare, 18 pazienti affetti da *acne vulgaris*, sono stati sottoposti a peeling seguito da dermoabrasione per la rimozione dello strato epidermico, sono stati divisi in due gruppi di cui uno trattato con un gel contenente l'estratto e l'altro trattato con lo stesso tipo di gel ma placebo.

L'applicazione è stata effettuata sulla zona trattata ogni giorno, due volte al giorno.

Risultati

Tra le 24 e le 48 ore dopo l'applicazione, si è resa visibile la vasocostrizione e la riduzione dell'edema, dopo il quarto giorno è stata evidenziata la riduzione delle croste e degli essudati e un giorno dopo la zona di guarigione nei pazienti trattati con l'estratto era doppia rispetto a quella del gruppo di controllo. La guarigione del gruppo trattato con

l'estratto vegetale risulta evidente 72 ore prima rispetto al gruppo di controllo.

Discussione

I risultati ottenuti nel trattamento dei danni indotti da peeling medio evidenziano le potenzialità modulatorie, cicatrizzanti ed antinfiammatorie dell'estratto in oggetto.

Il Mandatario

Dott. Roberto Pistolesi

Della Dragotti & Associati Srl

(Iscr. Albo No. 853)

RIVENDICAZIONI

1. Estratto di *Sedum Caeruleum* per uso terapeutico e/o cosmetico.
2. Estratto secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dall'essere un succo, un estratto fluido o un estratto secco.
3. Processo di preparazione di un estratto di *Sedum Caeruleum*, comprendente i seguenti passaggi:
 - a) centrifugazione della parte aerea della pianta *Sedum Caeruleum*, con conseguente ottenimento di un succo;
 - b) filtrazione del succo così ottenuto, con conseguente ottenimento di un succo filtrato;
 - c) concentrazione del succo filtrato così ottenuto, a dare un estratto concentrato.
4. Processo di preparazione di un estratto di *Sedum Caeruleum*, comprendente i seguenti passaggi:
 - a) centrifugazione della parte aerea della pianta *Sedum Caeruleum*, con conseguente ottenimento di un succo;
 - b) estrazione con acqua del succo così ottenuto, fornendo una soluzione acquosa dell'estratto;
 - c) precipitazione di detta soluzione acquosa con un solvente organico polare;
 - d) separazione della frazione isolata.
5. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 3-4, caratterizzato dal fatto che detta centrifugazione è effettuata ad una temperatura compresa tra 10°C e 20°C, per una durata di tempo compresa tra 3 e 5 minuti.

6. Processo secondo la rivendicazione 3, caratterizzato dal fatto che la concentrazione di cui al passaggio c) viene effettuata fino a raggiungere il 6 %, preferibilmente fino a raggiungere il 7 %, rispetto al peso totale del succo filtrato.
7. Processo secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che detta concentrazione viene effettuata ad una temperatura compresa tra 45°C e 50°C, per una durata di tempo compresa tra 1 ora e 3 ore per litro.
8. Processo secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che l'estrazione con acqua di cui al passaggio b) viene effettuata ad una temperatura compresa tra 80°C e 100°C, preferibilmente tra 85°C e 95°C, per una durata di tempo compresa tra 3 e 6 ore, più preferibilmente di circa 4 ore.
9. Processo secondo la rivendicazione 8, caratterizzato dal fatto che il rapporto in volume tra la quantità di acqua utilizzata per detta estrazione e la quantità di succo impiegata è compreso tra 5:1 e 20:1, preferibilmente è di circa 10:1, rispetto al volume del succo.
10. Processo secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che il solvente organico polare di cui al passaggio c) ha una temperatura compresa tra 0°C e -40°C, preferibilmente tra -20°C e -30°C.
11. Processo secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che la precipitazione di cui al passaggio c) viene effettuata ad una temperatura compresa tra 1°C e 10°C, preferibilmente tra 2°C e 5°C.
12. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-11, caratterizzato dal fatto che detto solvente organico polare è preferibilmente un solvente organico polare protico, più preferibilmente un solvente

alcolico, ancora più preferibilmente etanolo.

13. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-12, in cui il rapporto in volume tra la quantità di solvente polare utilizzato per detta precipitazione e la quantità di soluzione acquosa impiegata è compreso tra 2:1 e 5:1, preferibilmente è di circa 3:1, rispetto al volume di soluzione acquosa.

14. Frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi ottenibile mediante il processo secondo la rivendicazione 3.

15. Frazione secondo la rivendicazione 14, in cui il rapporto in peso tra detti polifenoli e detti flavonoidi è compreso tra 1,5 e 2,5, rispetto al peso totale della frazione.

16. Frazione polisaccaridica ottenibile mediante il processo secondo la rivendicazione 4.

17. Frazione secondo la rivendicazione 16, comprendente una quantità di polisaccaridi superiore al 90% in peso, preferibilmente superiore al 99% in peso, rispetto al peso totale della frazione.

18. Succo ottenibile mediante il processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 3-4.

19. Frazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 16-17, per uso nel trattamento delle lesioni della cute, delle mucose e dell'epitelio corneale.

20. Succo secondo la rivendicazione 18, per uso nel trattamento delle lesioni della cute, delle mucose e dell'epitelio corneale.

21. Frazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 14-15, per uso come agente antinfiammatorio.

22. Frazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 14-15, per uso cosmetico nel trattamento del *photoaging*.
23. Composizione essenzialmente costituita dalla frazione polisaccaridica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 16-17, e dalla frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 14-15.
24. Composizione secondo la rivendicazione 23, in cui il rapporto in peso tra detta frazione polisaccaridica e detta frazione ad elevato titolo di polifenoli e flavonoidi è compreso tra 5:1 e 50:1, preferibilmente tra 10:1 e 30:1, rispetto al peso totale della composizione.
25. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 23-24, per uso nel trattamento delle lesioni della cute, delle mucose e dell'epitelio corneale.
26. Formulazione comprendente un estratto secondo la rivendicazione 1, ed almeno un eccipiente fisiologicamente accettabile.
27. Formulazione secondo la rivendicazione 26, caratterizzata dal fatto di essere in forma topica, preferibilmente in forma di crema, unguento, pomata, soluzione, sospensione, polvere o gel, più preferibilmente in forma di gel o di crema.
28. Formulazione secondo la rivendicazione 26, caratterizzata dal fatto di essere una soluzione acquosa.
29. Formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 26-28, per uso oftalmico.

Il Mandatario

Dott. Roberto Pistolesi della Dragotti & Associati Srl (Iscr. Albo No. 853)

CLAIMS

1. *Sedum caeruleum* extract for therapeutic and/or cosmetic use.
2. Extract according to claim 1, characterized in being a juice, a fluid extract or a dry extract.
3. Process for the preparation of a *Sedum caeruleum* extract, comprising the following steps:
 - a) centrifugation of the aerial part of the *Sedum caeruleum* plant, with consequent obtainment of a juice;
 - b) filtration of the juice thus obtained, with consequent obtainment of a filtered juice;
 - c) concentration of the filtered juice thus obtained, to give a concentrated extract.
4. Process for the preparation of a *Sedum caeruleum* extract, comprising the following steps:
 - a) centrifugation of the aerial part of the *Sedum caeruleum* plant, with consequent obtainment of a juice;
 - b) extraction with water of the juice thus obtained, affording an aqueous solution of the extract;
 - c) precipitation of said aqueous solution with a polar organic solvent;
 - d) separation of the isolated fraction.
5. Process according to any one of claims 3-4, characterized in that said centrifugation is performed at a temperature comprised between 10°C and 20°C, for an amount of time comprised between 3 and 5 minutes.
6. Process according to claim 3, characterized in that the concentration

in step c) is carried out until obtaining 6%, preferably until obtaining 7 %, with respect to the total weight of the filtered juice.

7. Process according to claim 6, characterized in that said concentration is carried out at a temperature comprised between 45°C and 50°C, for an amount of time comprised between 1 hour and 3 hours per litre.

8. Process according to claim 4, characterized in that the extraction with water in step b) is carried out at a temperature comprised between 80°C and 100°C, preferably between 85°C and 95°C, for an amount of time comprised between 3 and 6 hours, more preferably of about 4 hours.

9. Process according to claim 8, characterized in that the volume ratio between the quantity of water used for said extraction and the quantity of used juice is comprised between 5:1 and 20:1, preferably is about 10:1, with respect to the volume of juice.

10. Process according to claim 4, characterized in that the polar organic solvent in step c) has a temperature comprised between 0°C and -40°C, preferably between -20°C and -30°C.

11. Process according to claim 4, characterized in that the precipitation in step c) is performed at a temperature comprised between 1°C and 10°C, preferably between 2°C and 5°C.

12. Process according to any one of claims 4-11, characterized in that said polar organic solvent is preferably a polar protic organic solvent, more preferably an alcoholic solvent, still more preferably ethanol.

13. Process according to any one of claims 4-12, wherein the volume ratio between the quantity of polar solvent used for said precipitation and

the quantity of aqueous solution used is comprised between 2:1 and 5:1, preferably is about 3:1, with respect to the volume of aqueous solution.

14. Fraction with high polyphenols and flavonoids titre obtainable through the process according to claim 3.

15. Fraction according to claim 14, wherein the weight ratio between said polyphenols and said flavonoids is comprised between 1.5 and 2.5, with respect to the total weight of the fraction.

16. Polysaccharidic fraction obtainable through the process according to claim 4.

17. Fraction according to claim 16, comprising a quantity of polysaccharides higher than 90% by weight, preferably higher than 99% by weight, with respect to the total weight of the fraction.

18. Juice obtainable through the process according to any one of claims 3-4.

19. Fraction according to any one of claims 16-17, for use in the treatment of skin, mucous membranes and corneal epithelium lesions.

20. Juice according to claim 18, for use in the treatment of skin, mucous membranes and corneal epithelium lesions.

21. Fraction according to any one of claims 14-15, for use as anti-inflammatory agent.

22. Fraction according to any one of claims 14-15, for cosmetic use in the treatment of photoaging.

23. Composition essentially consisting of the polysaccharidic fraction according to any one of claims 16-17, and of the fraction with high polyphenols and flavonoids titre according to any one of claims 14-15.

24. Composition according to claim 23, wherein the weight ratio between said polysaccharidic fraction and said fraction with high polyphenols and flavonoids titre is comprised between 5:1 and 50:1, preferably between 10:1 and 30:1, with respect to the total weight of the composition.
25. Composition according to any one of claims 23-24, for use in the treatment of skin, mucous membranes and corneal epithelium lesions.
26. Formulation comprising an extract according to claim 1, and at least a physiologically acceptable excipient.
27. Formulation according to claim 26, characterized in being in a topic form, preferably in form of a cream, unguent, ointment, solution, suspension, powder or gel, more preferably in form of a gel or a cream.
28. Formulation according to claim 26, characterized in being an aqueous solution.
29. Formulation according to any one of claims 26-28, for ophthalmic use.

Il Mandatario

Dott. Roberto Pistolesi

Della Dragotti & Associati Srl

(Iscr. Albo No. 853)

Figura 1

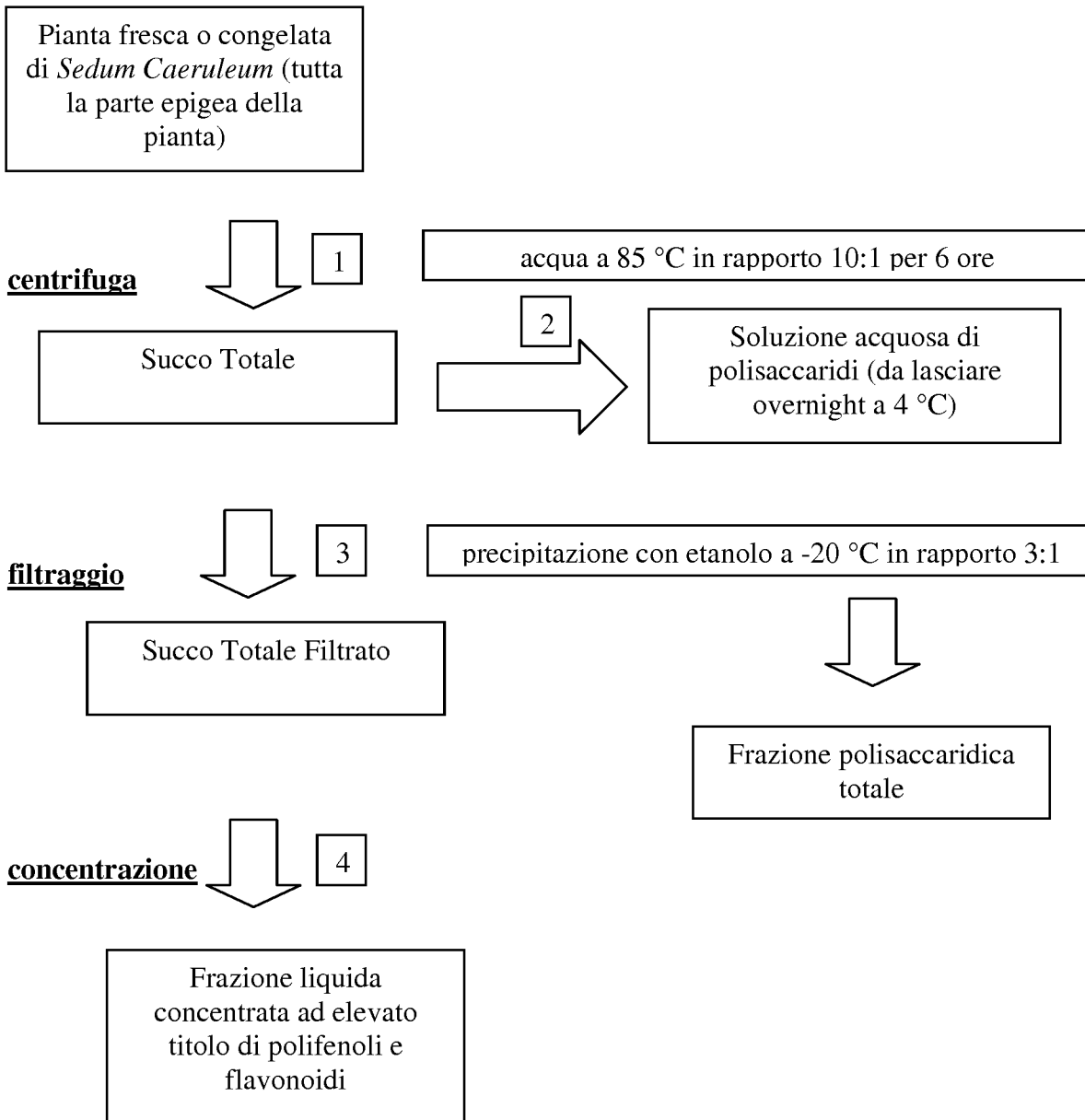
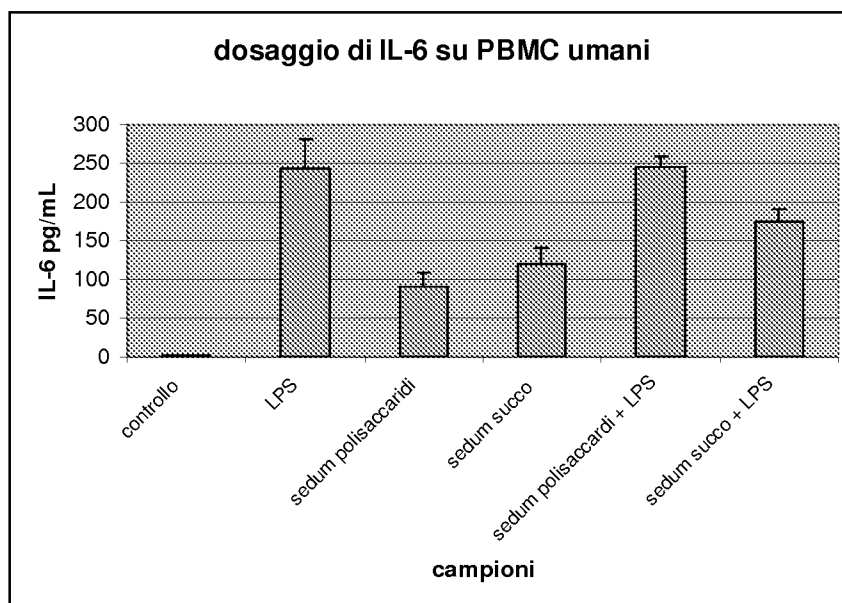


Figura 2



Sedum succo e sedum polisaccaridi vs controllo $p < 0,01$

Sedum succo + LPS vs LPS $p < 0,05$

Il Mandatario

Dott. Roberto Pistolesi

Della Dragotti & Associati Srl

(Iscr. Albo No. 853)