

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011901981338A1

Publication Date

20130323

Applicant

DEL CORSO SIMONE

Title

ESTRATTO DI HELICHRYSUM IN OLIO DI JOJOBA E COMPOSIZIONI A BASE
DI TALE ESTRATTO, IN PARTICOLARE, PER TRATTARE CONDIZIONI
DELLA PELLE

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:
"ESTRATTO DI HELICHRYSUM IN OLIO O CERA DI JOJOBA E
COMPOSIZIONI A BASE DI TALE ESTRATTO, IN PARTICOLARE, PER
TRATTARE CONDIZIONI DELLA PELLE", a nome di Simone DEL
5 CORSO, cittadino italiano residente a Pisa

DESCRIZIONE

Ambito dell'invenzione

La presente invenzione riguarda un estratto di una
pianta del genere *Helichrysum* (elicriso) in olio di jojoba
10 e un metodo per produrre tale estratto.

Inoltre, l'invenzione riguarda un medicamento, un
dispositivo medico o un cosmetico contenente un estratto di
una pianta del genere *Helichrysum* in olio di jojoba adatto
per il trattamento di malattie e/o condizioni particolari
15 della pelle di un essere umano o di un animale.

L'invenzione si riferisce anche a una composizione
contenente un tale estratto, avente un effetto repellente
per gli insetti.

Antecedenti dell'invenzione

20 In passato sono stati compiuti molti tentativi di
sviluppare farmaci sintetici o rimedi di origine naturale
per varie affezioni della pelle. Tuttavia, gli estratti
ottenuti da diversi tipi di piante, o da diverse parti
della stessa pianta spesso differiscono notevolmente nella
25 composizione e negli effetti.

In particolare, è noto l'uso in erboristeria e in
cosmesi di composizioni contenenti derivati di piante del
genere *Helichrysum* e cera di jojoba.

Elicriso

30 Il genere *Helichrysum* appartiene alla famiglia delle
Asteracee e comprende circa seicento specie di piante a

Ing. Marco Celestino
ABM Agenzia Brevetti & Marchi
Iscritto all'albo N. 544

fiore. Sono note varie specie di elicriso che contengono sostanze potenzialmente utili per trattare affezioni della pelle, ad esempio sostanze dotate di potere antiossidante. Tra tali specie, trova particolare impiego l'*Helichrysum italicum* o *angustifolium*, che cresce spontaneamente nell'Europa meridionale. In particolare, in Italia è comune al centro, al sud e nelle isole. Cresce in luoghi rocciosi, fino a circa 800 metri di altezza. Ha un portamento cespuglioso, di colore verde-argenteo, e raggiunge un'altezza di 30-40 cm. Fiorisce dalla fine della primavera all'inizio dell'autunno. I fiori sono riuniti in capolini con un involucro esterno costituito da petali di colore giallo scuro e un ricettacolo conico centrale che ospita i singoli fiori, che hanno colore giallo chiaro e sono di forma tubulare. L'*Helichrysum italicum* contiene vari tipi di sostanze come composti volatili, flavonoidi, terpenoidi ed altri. Altre specie appartenenti al genere *Helichrysum* che contengono sostanze potenzialmente utili per trattare le affezioni della pelle sono, ad esempio, *H. frigidum*, *H. litoreum*, *H. melitense*, *H. montelinasanum*, *H. nebrodense*, *H. rupestre* (var. *errerae*), *H. rupestre* (var. *melitense*), *H. rupestre* (var. *messerii*), *H. rupestre* (var. *pendulum*), *H. rupestre* (var. *rupestre*), *H. saxatile*, *H. siculum*, *H. stoechas*.

25 Crisina e altri flavonoidi

Sono altresì note le proprietà antiossidanti, antiinfiammatorie, antimicrobiche di flavonoidi come Crisina, Galangina, Pinocembrina, notoriamente presenti in molte piante del genere *Helichrysum*.

30 Più in dettaglio, la Crisina (5,7-Dihydroxy-2-phenyl-4H-benzo[b]pyran-4-one) può attenuare l'apoptosi, la produzione di sostanze reattive con l'ossigeno (ROS), ed anche l'espressione della cicloossigenasi 2 (COX-2) indotta

da UVB e UVA. La Crisina inverte in modo predominante la sottoregolazione dell'acquaporina 3 (AQP-3) ad opera degli UVB. Essa inverte in modo predominante l'attivazione di JNK e inibisce debolmente l'attivazione di p38 provocata dagli UVA e dagli UVB. L'applicazione topica della Crisina è seguita da un efficace assorbimento percutaneo e non dà luogo a irritazione della pelle. Globalmente, i risultati hanno dimostrato significativi benefici della Crisina sulla protezione dei cheratinociti contro lesioni indotte da fattori citotossici come UVA e UVB. Vedasi Wu, Nan-Lin et al., Chrysin Protects Epidermal Keratinocytes from UVA- and UVB-Induced Damage, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011 59 8391-8400.

FR 2906716 descrive l'uso della Crisina in composizioni cosmetiche per il trattamento della pelle grassa, e la sua efficacia per inibire la proliferazione di sebociti umani.

US 2005/0049206 descrive un gruppo di flavonoidi, e di estratti che li contengono, che hanno proprietà farmaceutiche utili nella terapia di malattie fibrotiche per proteggere o trattare o riparare tessuti lesionali fibrotici.

European Journal of Medicinal Chemistry, 46, 1, 2011, 393-398 tratta della Crisina e di suoi analoghi come agenti immunosoppressori e potenzialmente utili in patologie come la psoriasi.

Composti volatili dell'Elicriso

WO 2007/066305 descrive effetti analgesici nel corpo umano o animale di una composizione contenente uno o più sesquiterpeni.

Le aldeidi trans-2-decenale ((E)-2-Decenale) e nonanale hanno proprietà repellenti per gli insetti. Vedasi, ad esempio, US 2007/0154504, JP 2006/327957, che descrive l'uso contro il Dermatophagoides farinae, e US 6,524,605

che descrive composizioni comprendenti un monoterpenoide o un sesquiterpenoide efficace per respingere artropodi come scarafaggi, zanzare, zecche, ragni, ed altri.

5 Inoltre, le aldeidi trans-2-decenale e nonanale sono classificate nella banca dati CosIng come ingredienti cosmetici, in particolare come agenti profumanti.

Jojoba

10 L'olio o cera di jojoba è ricavato dai semi di jojoba o *Simmondsia chinensis*, una pianta a portamento arbustivo di alcune zone desertiche dell'America settentrionale. L'olio di jojoba è presente nei semi, in una percentuale in peso normalmente superiore al 50%. Si veda ad es. D.J. Undersander, et al., *Jojoba. Alternative Field Crops Manual*, 1990.

15 La cera di jojoba ha una struttura molto simile al sebo umano, con cui è completamente miscibile. Per questo, essa è tollerata dalla pelle umana molto meglio di altri oli vegetali, e non occlude i pori. Non evaporando, fornisce un'idratazione più duratura rispetto alle formulazioni idratanti a base acquosa. Inoltre, è molto stabile chimicamente, non irrancidisce e non perde agenti antiossidanti anche dopo conservazione prolungata.

Prodotti a base di elicriso e jojoba

25 Un esempio di composizione di *Helichrysum* in cera di jojoba si trova nel prodotto omeopatico "Eczema no more". Tuttavia, non è noto il tipo di elicriso impiegato. Inoltre, sembra che venga utilizzato olio essenziale di elicriso, ossia un prodotto ottenuto mediante distillazione in corrente di vapore dell'elicriso.

30 Un altro esempio si trova in ITPI2001A000056, che descrive un metodo di produzione di estratti di *Helichrysum italicum* in cera di jojoba, in cui dei capolini di elicriso vengono macerati in un olio di jojoba, in particolare con

un rapporto Helichrysum:olio compreso tra 0,2 e 0,3. La macerazione può essere seguita da torchiatura e da aggiunta di un olio essenziale di camomilla. Non è tuttavia specificata la composizione chimica del prodotto ottenuto, né quella dei materiali di partenza utilizzati.

La presenza di sostanze provenienti da elicriso ed eventualmente olio di jojoba in preparati per il trattamento di condizioni della pelle viene inoltre riferita nelle pubblicazioni KR20110023257, US2004258783A1, WO2008053246A1, GB2472379, EP2018892.

Sostanze repellenti per gli insetti

Sono inoltre note sostanze che hanno effetto repellente per gli insetti. Tali sostanze sono utili in aree, come le zone tropicali, in cui gli insetti sono veicolo di pericolose malattie come malaria, febbre del Nilo occidentale, febbre dengue, ed altre.

...

Come noto, la pelle comprende un sottile strato superficiale, l'epidermide, che fornisce la resilienza e le proprietà di barriera, ed è formato da molti tipi cellulari. I cheratinociti costituiscono la maggioranza delle cellule dell'epidermide, nel caso dell'uomo il 75-80%.

In numerose malattie e/o condizioni che coinvolgono la pelle può essere desiderabile stimolare la proliferazione delle cellule cheratinociti dell'epidermide.

Infatti, la pelle è dotata di meccanismi di rigenerazione e di riparazione che intervengono sia fisiologicamente, sia in presenza di condizioni particolari come lesioni. È noto che i meccanismi di proliferazione dei cheratinociti sono coinvolti in numerose malattie e/o condizioni cutanee, come invecchiamento cutaneo, ustioni, in particolare solari, ed altre ancora.

Vi è quindi necessità di un nuovo medicamento o cosmetico o dispositivo medico che sia efficace per trattare malattie e/o condizioni della pelle come quelle
5 sopra indicate. In particolare, vi è necessità di un nuovo medicamento o cosmetico o dispositivo medico che sia in grado di stimolare la proliferazione di cheratinociti.

Vi è altresì necessità di un nuovo medicamento o cosmetico o dispositivo medico che abbia effetto repellente
10 sugli insetti.

Sintesi dell'invenzione

È quindi scopo dell'invenzione fornire un estratto di una pianta del genere Helichrysum in olio di jojoba che permetta di trattare varie affezioni della pelle, ad
15 esempio invecchiamento cutaneo, e ustioni di vario tipo, in modo più efficace rispetto ai prodotti e agli estratti a base di Helichrysum attualmente conosciuti.

È anche scopo dell'invenzione fornire un estratto di una pianta del genere Helichrysum in olio di jojoba che
20 permetta di stimolare la proliferazione di cellule cheratinociti dell'epidermide in modo più efficace di quanto non accada con i suddetti prodotti ed estratti conosciuti, per trattare affezioni della pelle.

È anche scopo dell'invenzione fornire un siffatto
25 estratto che abbia minore tendenza a provocare fenomeni di sensibilizzazione cutanea e/o fenomeni allergici rispetto ai prodotti di tecnica nota.

È inoltre scopo della presente invenzione fornire un estratto di elicriso in olio di jojoba che sia efficace per
30 respingere vari tipi di insetti.

È anche scopo della presente invenzione fornire un metodo per la preparazione di un siffatto estratto di elicriso.

Questi ed altri scopi sono raggiunti da un metodo per preparare un estratto di una pianta del genere *Helichrysum* in olio o cera di jojoba, tale metodo comprendendo le fasi di:

- 5 - predisposizione di una parte della pianta scelta tra le parti aeree superiori della pianta, in particolare le sommità fiorite;
- predisposizione di un olio di jojoba avente un'acidità superiore a 0,3, espressa come numero acido;
- 10 - contatto di detta parte di pianta del genere *Helichrysum* con l'olio di jojoba in condizioni di estrazione;
- recupero dell'estratto ottenuto nella fase di contatto.

Per parti aeree superiori si intendono le parti non
15 legnose della pianta, ossia in particolare i capolini, gli steli apicali, e le prime foglie.

Il numero acido è definito come la quantità di idrossido di potassio (KOH) in milligrammi che è necessaria per neutralizzare un grammo di olio.

20 È stato infatti sorprendentemente scoperto che un olio di jojoba più acido, e quindi considerato più scadente per molte applicazioni di tale olio, ha un elevato potere solubilizzante per i flavonoidi. In altre parole, esso favorisce l'estrazione dei flavonoidi, aumentandone i
25 valori di concentrazione negli estratti. Allo stesso tempo, estratti formulati a partire da un olio di acidità scelto tra quelli indicati sono di migliore qualità, poiché presentano un livello di allergeni inaspettatamente basso.

In particolare l'acidità è superiore a 0,32, più in
30 particolare è superiore a 0,36.

Tale metodo permette di ottenere un estratto di una pianta del genere *Helichrysum* in olio di jojoba caratterizzato dal fatto di comprendere un contenuto di

Crisina (5,7-Dihydroxy-2-phenyl-4H-benzo[b]pyran-4-one)
superiore a 80 mg per kg di acidi grassi a venti atomi di
carbonio ed aventi una sola insaturazione.

Preferibilmente, il contenuto di Crisina è superiore a
5 84 mg/kg di tali acidi grassi con 20 atomi di carbonio e
una sola insaturazione, più preferibilmente è superiore a
104 mg/kg di tali acidi grassi. Gli acidi grassi a 20 atomi
di carbonio aventi una sola insaturazione formano da circa
il 65% a circa l'80% dell'olio di jojoba.

10 Infatti, gli inventori hanno osservato che un estratto
di elicriso in olio di jojoba risulta essere ricco dei
seguenti flavonoidi: Crisina, Galangina, Pinocembrina. Di
tali flavonoidi sono note, come anticipato, le proprietà
antiossidanti, antiinfiammatorie, antimicrobiche.

15 Inoltre, gli inventori hanno sorprendentemente trovato
che un estratto di elicriso in olio di jojoba che sia
particolarmente ricco di flavonoidi come Crisina,
Galangina, Pinocembrina, ha proprietà stimolanti la
crescita di cheratinociti, indipendentemente dall'azione di
20 fattori citotossici come le radiazioni UV.

Nella caratterizzazione dell'estratto si fa
riferimento alla Crisina, anziché al contenuto totale di
flavonoidi, poiché la Crisina è il flavonoide più
abbondante, seguita da Galangina e Pinocembrina. Si
25 osserva comunque che le quantità di questi tre flavonoidi
sono correlate tra di loro, in altre parole vi è una
sostanziale proporzionalità tra la concentrazione di
Galangina e di Pinocembrina rispetto alla concentrazione
di Crisina. Inoltre, il metodo analitico per determinare
30 la concentrazione della sola Crisina porta a risultati
meno variabili, e quindi più affidabili, rispetto al
metodo per quantificare tutti i flavonoidi.

Tale metodo permette altresì di ottenere un estratto di

una pianta del genere *Helichrysum* in olio ossia in cera di jojoba, caratterizzato da un rapporto in peso del limonene (S-(-)-4-isopropenil-1-metil-1-cicloesene; R-(+)-4-isopropenil-1-metil-1-cicloesene) rispetto al β -selinene ((3S,4aR,8aS)-8a-metil-5-metilidene-3-prop-1-en-2-il-1,2,3,4,4a,6,7,8-ottaidronaftalene) inferiore a 0,4.

Preferibilmente, il rapporto in peso limonene : β -selinene è inferiore a 0,08 e ancor più preferibilmente tale rapporto in peso è inferiore a 0,06.

Anche in questo caso, per caratterizzare la presenza di limonene, si è scelto come riferimento il β -selinene in quanto è il componente più abbondante della frazione volatile dell'estratto, e in questo modo il metodo per determinare la quantità di limonene fornisce risultati più affidabili. Il rapporto limonene : β -selinene può essere determinato come rapporto tra le aree dei rispettivi picchi di un tracciato ottenuto con un'analisi cromatografica.

Gli inventori hanno infatti osservato che la parte volatile di un estratto di *Helichrysum* in cera di jojoba è particolarmente ricca di: β -selinene; trans-2-decenale; α -selinene; AR-curcumene; nonanale, di cui sono noti gli effetti analgesici, come anticipato. Sorprendentemente, al contrario, e a differenza dell'olio essenziale, tale estratto è particolarmente povero di limonene, un noto agente allergizzante. Inoltre, gli inventori hanno trovato che l'estratto di *Helichrysum* in jojoba contiene molto meno limonene rispetto all'olio essenziale di *Helichrysum*.

Come anticipato, alcune delle sostanze della parte volatile, ad esempio trans-2-decenale, AR-curcumene, nonanale ed ottanale sono inoltre repellenti per gli insetti.

Pertanto, l'estratto secondo l'invenzione ha una minore tendenza a provocare fenomeni di sensibilizzazione

cutanea e/o fenomeni allergici rispetto ai prodotti conosciuti.

5 Inoltre, l'estratto secondo l'invenzione permette di realizzare formulazioni per trattare condizioni specifiche della pelle che traggono vantaggio da una azione stimolante la proliferazione dei cheratinociti che siano anche ipoallergeniche ed analgesiche.

10 In particolare, la pianta del genere *Helichrysum* appartiene alla specie *Helichrysum italicum*, in particolare *Helichrysum italicum* subspecie *italicum*, *Helichrysum italicum* subspecie *microphyllum*, *Helichrysum italicum* subspecie *serotinum*, *Helichrysum italicum* subspecie *siculum*, *Helichrysum italicum* variante *pseudolitoreum*, *Helichrysum italicum* variante *typicum*,
15 *Helichrysum italicum* variante *picardii*, *Helichrysum italicum* variante *HyperCreso*, *Helichrysum italicum* subspecie *italicum* variante *corsa*.

In particolare, la pianta del genere *Helichrysum* appartiene alla specie *Helichrysum stoechas*.

20 In particolare, la pianta del genere *Helichrysum* appartiene alla specie *Helichrysum arenarium*.

Come sarà descritto nel seguito, l'arricchimento di composti come flavonoidi, terpenoidi ed altri, sopra indicati, rispetto agli estratti di *Helichrysum* conosciuti
25 e ai prodotti conosciuti a base di *Helichrysum* e olio di jojoba, può essere ottenuto selezionando in modo opportuno la parte della pianta che viene sottoposta a estrazione, in particolare impiegando le parti aeree superiori, più in particolare i fiori, come materiale da cui ricavare
30 l'estratto.

In aggiunta, o in alternativa, l'arricchimento nei composti sopra indicati può essere ottenuto scegliendo in modo opportuno l'olio di jojoba, in particolare scegliendo

un olio avente un'acidità superiore a 0,3.

In aggiunta, o in alternativa, l'arricchimento nei composti sopra indicati può essere ottenuto eseguendo l'estrazione, ossia il contatto tra la pianta del genere
5 Helichrysum e l'olio di jojoba, con un'operazione dinamica, ad esempio un'operazione di percolazione e/o di centrifugazione.

In particolare, la pianta del genere Helichrysum appartiene ad una specie scelta tra:

- 10 - Helichrysum italicum, in particolare Helichrysum italicum subspecie italicum, Helichrysum italicum subspecie microphyllum, Helichrysum italicum subspecie serotinum, Helichrysum italicum subspecie siculum, Helichrysum italicum variante pseudolitoreum,
15 Helichrysum italicum variante typicum, Helichrysum italicum variante picardii, Helichrysum italicum variante HyperCreso, Helichrysum italicum subspecie italicum variante corsa;
- Helichrysum stoechas;
- 20 - Helichrysum arenarium.

Il metodo può comprendere una fase di aggiunta di componenti farmaceuticamente e/o cosmeticamente accettabili atti ad aumentare la solubilità della Crisina e di altri flavonoidi, tali componenti essendo scelti, in particolare,
25 tra glicol propilenico, glicerina e ciclodestrine.

L'arricchimento in principi attivi utili come i flavonoidi sopra indicati può essere ottenuto scegliendo il metodo di estrazione. La fase di contatto tra la parte di Helichrysum italicum e l'olio di jojoba può essere eseguita
30 con una qualsiasi tecnica di estrazione nota nell'arte. Vantaggiosamente, la fase di contatto viene eseguita con una tecnica scelta tra macerazione e una tecnica dinamica, in cui l'olio di jojoba è in movimento rispetto ad una

massa di elicriso, scelta tra percolazione e centrifugazione.

Preferibilmente, la fase di contatto viene eseguita con una tecnica di percolazione. Infatti, con la tecnica di percolazione si ottiene un estratto che ha al tempo stesso un maggior contenuto di flavonoidi e un minor contenuto di limonene rispetto agli estratti ottenibili dalla stessa pianta e con lo stesso olio, ed eseguendo le altre fasi del metodo nelle medesime condizioni operative.

Vantaggiosamente, la fase di contatto viene eseguita a una temperatura di contatto compresa tra 25°C e 90°C, in particolare tra 50°C e 85°C, più in particolare tra 70°C e 80°C. In questo modo è possibile elevare ulteriormente il potere solvente dell'olio di jojoba nei confronti dei flavonoidi presenti nell'elicriso, senza comprometterne le caratteristiche. In particolare, in tal modo è possibile ottenere concentrazioni di flavonoidi superiori rispetto ai prodotti di tecnica nota anche eseguendo la fase di contatto in condizioni statiche, ad esempio in condizioni di macerazione.

Vantaggiosamente, la fase di contatto viene eseguita con una quantità di elicriso compresa tra 150 e 350 g su 1000 ml di olio di jojoba, in particolare tra 200 e 320 g su 1000 ml di olio di jojoba, più in particolare tra 220 e 300 g su 1000 ml di olio di jojoba.

Vantaggiosamente, la fase di predisposizione di detta parte della pianta da destinare a estrazione comprende una fase di essiccamento di detta parte della pianta. Un altro vantaggio dell'uso di parti aeree essiccate consiste nell'ottenimento di un estratto sostanzialmente esente da umidità acquosa. Ciò permette di sfruttare il carattere antiossidante di alcuni componenti dell'olio di jojoba, che non richiedono l'impiego di composti per la conservazione

come antiossidanti di sintesi.

Vantaggiosamente, la fase di predisposizione di detta parte della pianta da destinare a estrazione comprende una fase di esecuzione di un taglio tisana, ossia di una fase di frantumazione.

In particolare, l'estratto dell'invenzione può essere ottenuto da soli fiori secchi di *Helichrysum*, piuttosto che da altre parti della pianta. Ad esempio, i fiori di *Helichrysum italicum* provengono preferibilmente da pianta italiana spontanea e vengono raccolti durante il periodo balsamico.

Un vantaggio dell'utilizzo di parti aeree superiori e/o di un olio di jojoba con un elevato potere solubilizzante per i flavonoidi è che si ottiene un estratto la cui frazione volatile comprende:

- elevate quantità di flavonoidi come Crisina, Galangina, Pinocembrina, ottenendo un estratto le cui proprietà stimolanti la crescita di cheratinociti sono state menzionate in precedenza, e in particolare,
- elevate quantità di Crisina, che è un flavonoide le cui note proprietà fotoprotettive e citoprotettive per i cheratinociti sono state indicate in precedenza;
- elevate quantità di Galangina e di Pinocembrina che sono notoriamente antiossidanti, antiinfiammatori e antimicrobici;
- elevate quantità β -selinene e/o α -selinene e/o trans-2-decenale e/o AR-curcumene e/o nonanale e/o ottanale, che sono notoriamente repellenti per gli insetti;
- basse quantità di limonene, che è un allergene.

La fase di recupero dell'estratto, può essere eseguita con qualsiasi metodo noto nell'arte, in particolare mediante una tecnica scelta tra torchiatura, pressatura idraulica, filtrazione, centrifugazione, o una combinazione

di tali tecniche.

L'estratto può essere utilizzato come ottenuto dalle precedenti fasi della lavorazione, oppure il metodo può prevedere inoltre una fase di post-trattamento dell'estratto recuperato nella fase di recupero dell'estratto. In particolare di una fase di post-trattamento può essere:

- una fase di diluizione, ad esempio per ripristinare nell'estratto il volume di olio di jojoba inizialmente utilizzato;
- una fase di sterilizzazione;
- una fase di ulteriore estrazione;
- una fase di separazione di un componente.

Indipendentemente dall'esecuzione di una di tali fasi di post-trattamento, il metodo può prevedere inoltre una fase di aggiunta di sostanze di varia natura. Per esempio, può essere prevista una fase scelta tra aggiunta di ulteriori principi attivi.

Il metodo può inoltre prevedere una fase di confezionamento dell'estratto di *Helichrysum* in una forma adatta alla distribuzione.

L'estratto di *Helichrysum italicum* dell'invenzione può essere utilizzato come principio attivo di un medicamento o di un cosmetico, così come può essere utilizzato in un dispositivo medico.

Sebbene l'estratto di *Helichrysum italicum* dell'invenzione possa essere utilizzato come tale, esso può essere incorporato in un medicamento o in un cosmetico con l'aggiunta di qualsiasi eccipiente farmaceuticamente o cosmeticamente accettabile, per esempio un riempitivo, un addensante, o altro eccipiente noto nella tecnica farmaceutica o nella tecnica della preparazione dei cosmetici.

Rientra quindi nell'invenzione anche un medicamento o un cosmetico o un dispositivo medico contenente l'estratto sopra descritto ottenuto da una pianta del genere *Helichrysum* in olio di jojoba, ovvero un estratto ottenuto con il metodo sopra descritto, per trattare malattie e/o condizioni per le quali è utile una stimolazione della proliferazione di cheratinociti.

In particolare, tale medicamento o cosmetico o dispositivo medico è idoneo per trattare:

- 10 - ferite, compresi tagli, escoriazioni, abrasioni, punture di insetti, ferite da arma da taglio, ferite da arma da fuoco, ferite chirurgiche, ecc.;
- ustioni, comprese ustioni da radiazione ultravioletta, ustioni solari, ustioni da radioterapia, ustioni da fiamma viva, ustioni da contatto con corpi caldi, 15 ustioni da sostanze acide, ustioni da sostanze caustiche, ecc.;
- ulcere cutanee, comprese piaghe da decubito, piaghe dovute a diabete, ecc.;
- 20 - cicatrici, comprese cicatrici post-operatorie, cicatrici dovute ad accumulo eccessivo di tessuto connettivo a seguito di un danno tissutale, cicatrici atrofiche, cicatrici da acne, ecc.;
- invecchiamento cutaneo, compresi invecchiamento dovuto all'età, invecchiamento dovuto a radiazione 25 ultravioletta, invecchiamento dovuto ad inquinamento ambientale, invecchiamento dovuto a fattori atmosferici, invecchiamento dovuto a fattori ormonali, ecc.;
- 30 - smagliature, comprese smagliature dovute a gravidanza, smagliature dovute a marcate variazioni di peso corporeo, smagliature dovute a fattori ormonali, ecc.;
- rughe, comprese le rughe d'espressione, ecc.

In ragione delle proprietà dei flavonoidi e dei composti presenti nella frazione volatile dell'estratto, il medicamento o cosmetico o dispositivo medico può mostrare effetti benefici come effetti antimicrobici, antibatterici, protettivi nei confronti della radiazione ultravioletta, antiinfiammatori, antiossidanti, analgesici, sebo(ri)equilibranti ossia nel trattamento della seborrea oleosa, nella prevenzione della formazione di tessuti lesionali fibrotici, nella prevenzione di lesioni dovute a psoriasi.

Il medicamento dell'invenzione può essere formulato in qualsiasi forma adatta a qualsiasi via di somministrazione. La via di somministrazione preferita è una qualsiasi via di somministrazione topica.

La preparazione del medicamento o del cosmetico può essere eseguita mediante tecniche note della farmaceutica o della cosmetica standard. Tali tecniche sono descritte, per esempio, in Remington's Pharmaceutical Science, 18^{ma} edizione, a cura di Gennaro et al., 1980, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Vantaggiosamente, la composizione comprende un olio essenziale. In particolare tale olio essenziale è scelto tra: olio essenziale di camomilla romana; olio essenziale di camomilla matricaria; olio essenziale di garofano; olio essenziale di tea tree; olio essenziale di lavanda; olio essenziale di origano, o loro miscele. In particolare, la camomilla romana, oltre a conferire un aroma più gradevole alla composizione, ha un potere antinfiammatorio che esalta l'efficacia dell'estratto di Helichrysum, con un effetto sinergico.

Rientra nell'ambito dell'invenzione anche l'uso dell'estratto sopra descritto per la preparazione di un siffatto medicamento o cosmetico o dispositivo medico.

Rientra nell'ambito dell'invenzione anche una composizione repellente per gli insetti contenente l'estratto sopra descritto di una pianta del genere *Helichrysum*.

- 5 Rientra nell'ambito dell'invenzione anche l'uso dell'estratto sopra descritto per la preparazione di una composizione repellente per gli insetti e/o per gli acari.

Breve descrizione dei disegni

10 L'invenzione verrà di seguito illustrata con la descrizione che segue di sue forme realizzative, fatta a titolo esemplificativo e non limitativo, con riferimento ai disegni annessi in cui:

- le Figure 1a-1d mostrano l'analisi di un olio essenziale di *Helichrysum Italicum*;
- 15 - la Figura 2 mostra un profilo cromatografico dell'olio essenziale delle figure 1a-1d;
- La figura 3 è una micrografia di tre lastre di analisi cromatografica su strato sottile di campioni di estratti di *Helichrysum italicum* in olio di jojoba;
- 20 - La Figura 4 mostra l'andamento della proliferazione percentuale di cheratinociti in un terreno di coltura in presenza di varie concentrazioni di tre estratti di *Helichrysum Italicum* in olio di jojoba, e di un olio essenziale di *Helichrysum italicum*;
- 25 - La Figura 5 mostra le correlazioni positive tra le quantità di alcuni composti rinvenuti in estratti di *Helichrysum Italicum* in olio di jojoba e la percentuale di proliferazione su cellule cheratinociti con estratto alla concentrazione dell'1%.

ESEMPI

1. Analisi chimica degli oli di jojoba

Gli oli o cere di jojoba utilizzati sono caratterizzati dai parametri di analisi chimico-fisica riportati in Tabella 1.

- Tabella 1 -

	VALORE	METODO
Aspetto	Liquido chiaro	
Colore (Gardner)	15 max.	
Odore	leggero	
Peso specifico, 20°C, g/ml	0.860 - 0.870	ISO 6883
Indice di rifrazione, 20°C	1.4640 - 1.4680	ISO 6320
Numero acido	2 max.	ISO 660
Numero di Iodio	80 - 90	ISO 3961
Equivalente di saponificazione	85 - 98	ISO 3657
Numero di Perossido, meq/kg	5 max.	ISO 3960
Fraz. non saponificabile, %	45 - 55	ISO 3596-1
Composizione degli acidi grassi (% sul totale degli a.g.)		GC
C16:0	3 max.	
C16:1	1 max.	
C18:1	5 - 15	
C20:1	65 - 80	
C22:1	10 - 20	
C24:1	1 - 3	
C26:1	0 - 1	
Store away from heat and light.		

2. Materiali impiegati e condizioni della fase di estrazione.

Esempio 1

10 Estrazione per macerazione. Sono stati rispettati i seguenti parametri operativi:

- temperatura: ambiente;
- durata totale della macerazione: 28 giorni;

*Ing. Marco Celestino
ABM Agenzia Brevetti & Marchi
Iscritto all'albo N. 544*

- acidità dell'olio di jojoba = 0,38;
- quantità di olio utilizzata = 1000 ml;
- tipo di pianta utilizzata: *Helichrysum italicum* essiccato, taglio tisana;
- 5 - quantità di pianta utilizzata = 250 g;
- rapporto elicriso:olio = 0,25 g/ml;
- acidità dell'olio di jojoba = 0,38;
- Rapporto elicriso : olio = 0,25.

Esempio 2

- 10 Estrazione per percolazione in un estrattore micro 1 litro privo di doppio pistone, quindi con percolazione per semplice caduta dell'olio attraverso un letto di elicriso, e senza ricircolo esterno dell'olio. Sono stati rispettati i seguenti parametri operativi:
- 15 - temperatura: ambiente;
 - tempo di pressione = 3 minuti;
 - tempo di depressione = 6 minuti;
 - numero di cicli = 88;
 - tempo totale dei cicli: 792 minuti;
 - 20 - acidità dell'olio di jojoba = 0,38;
 - quantità di olio utilizzata = 1100 ml;
 - tipo di pianta utilizzata: *Helichrysum italicum* essiccato, taglio tisana;
 - quantità di pianta utilizzata = 275 g;
 - 25 - rapporto elicriso:olio = 0,25 g/ml.

Esempio 3

- Estrazione per percolazione forzata in un estrattore rapido Timatic modello 5p, dotato di doppio pistone. L'olio viene pescato e fatto ricircolare nella camera
- 30 estrattiva. Sono stati rispettati i seguenti parametri operativi:
- temperatura: ambiente;

- numero percolazioni forzate: 5, con ricircolo esterno attivato;
- tempo di pressione = 3 minuti;
- tempo di depressione = 6 minuti;
- 5 - pressione di esercizio = 8,0 bar;
- tempo totale di estrazione = 891 minuti;
- numero di cicli = 99;
- acidità dell'olio di jojoba = 0,2;
- Quantità di olio utilizzata = 6000 ml;
- 10 - tipo di pianta utilizzata: *Helichrysum italicum* essiccato, taglio tisana;
- quantità di pianta utilizzata = 800 g;

Rapporto elicriso:olio = 0,13 g/ml.

3. Analisi dei flavonoidi degli estratti

- 15 L'analisi dei flavonoidi è stata eseguita mediante HPLC dall'azienda Chelab (Resana, TV, Italia) sotto vincolo di riservatezza. La descrizione dettagliata della procedura analitica è disponibile presso tale ditta. I risultati dell'analisi sono riportati nelle Tabelle 2a, 2b,
- 20 2c, rispettivamente per gli estratti degli esempi 1, 2 e 3.

- Tabella 2a -

Analisi dei flavonoidi dell'estratto dell'esempio 1

FLAVONOIDI

Met.: MP 0679 rev 4 2011

Rutina	< LoQ	mg/kg
Esperidina	< LoQ	mg/kg
Naringina	< LoQ	mg/kg
Neoesperidina	< LoQ	mg/kg
Diosmina	< LoQ	mg/kg
Taxifolina	< LoQ	mg/kg
Miricetina	< LoQ	mg/kg
Quercetina	< LoQ	mg/kg
Esperetina	< LoQ	mg/kg
Naringenina	< LoQ	mg/kg
Apigenina	< LoQ	mg/kg
Canferolo	< LoQ	mg/kg
Pinocembrina	38,5	mg/kg
Crisina	123	mg/kg
Flavonoidi	< LoQ	mg/kg
Galangina	57,3	mg/kg
<hr/>		
Somma dei flavonoidi quantificati	225,8	mg/Kg

5

- Tabella 2b -

Analisi dei flavonoidi dell'estratto dell'esempio 2

FLAVONOIDI

Met.: MP 0679 rev 4 2011

Rutina	< LoQ	mg/kg
Esperidina	< LoQ	mg/kg
Naringina	< LoQ	mg/kg
Neoesperidina	< LoQ	mg/kg
Diosmina	< LoQ	mg/kg
Taxifolina	< LoQ	mg/kg
Miricetina	< LoQ	mg/kg
Quercetina	< LoQ	mg/kg
Esperetina	< LoQ	mg/kg
Naringenina	< LoQ	mg/kg
Apigenina	< LoQ	mg/kg
Canferolo	< LoQ	mg/kg
Pinocembrina	44,9	mg/kg
Crisina	130	mg/kg
Flavonoidi	< LoQ	mg/kg
Galangina	67	mg/kg
<hr/>		
Somma dei flavonoidi quantificati	241,9	mg/Kg

Ing. Marco Celestino
ABM Agenzia Brevetti & Marchi
Iscritto all'albo N. 544

- Tabella 2c -

Analisi dei flavonoidi dell'estratto dell'esempio 3

FLAVONOIDI

Met.: MF 0678 rev 4 2011

Rutina	< LoQ	mg/kg
Esperidina	< LoQ	mg/kg
Naringina	< LoQ	mg/kg
Neoesperidina	< LoQ	mg/kg
Diosmina	< LoQ	mg/kg
Taxifolina	< LoQ	mg/kg
Miricetina	< LoQ	mg/kg
Quercetina	< LoQ	mg/kg
Esperetina	< LoQ	mg/kg
Naringenina	< LoQ	mg/kg
Apigenina	< LoQ	mg/kg
Canferolo	< LoQ	mg/kg
Pinocembrina	23,6	mg/kg
Crisina	75	mg/kg
Flavonoidi	< LoQ	mg/kg
Galangina	33,8	mg/kg
<hr/>		
Somma dei flavonoidi quantificati	132,4	mg/Kg

5 4. Analisi gascromatografica
 della frazione volatile degli estratti

L'analisi della frazione volatile è stata eseguita mediante gas-cromatografia da Chelab (Resana, TV, Italia).

10 In particolare, lo studio di composizione della frazione volatile, ossia della frazione aromatizzante "attiva", è stato effettuato mediante analisi GC/MS e GC/FID degli estratti ottenuti. Sono state applicate tecniche di estrazione diverse ma complementari tra loro per quanto riguarda il tipo di informazioni fornite. Ciò
15 aveva lo scopo di definire il protocollo analitico migliore da utilizzare per l'analisi del profilo aromatico.

20 Il protocollo che prevede l'analisi di estratti ottenuti mediante SDE si è dimostrato essere il più idoneo per la caratterizzazione e per la comparazione dei

*Ing. Marco Celestino
ABM Agenzia Brevetti & Marchi
Iscritto all'albo N. 544*

campioni, poiché garantisce una migliore riproducibilità e una sensibilità migliore nei confronti di alcuni composti importanti.

La composizione delle frazioni volatili degli estratti degli esempi 1, 2 e 3 è riportata in Tabella 3, con riferimento ai composti ritenuti più significativi. I valori di distribuzione relativa dei composti elencati, valutati come aree percentuali del tracciato gas cromatografico, sono stati normalizzati rispetto alla somma totale dei soli composti volatili considerati.

A titolo di confronto, nelle Figure 1a-1d e 2 viene riportata l'analisi dell'olio essenziale di elicriso utilizzato come riferimento, acquistato da Daniele Patrizia Erboristeria Balaina Lu Caprileddu, Luogosanto, Olbia Tempio, Sardegna, Italia.

Inoltre, come riportato in Parasitol. Res. (2010) 107, 1455-146, uno studio cromatografico su campioni di olio essenziale di elicriso ha rivelato che i principali costituenti sono:

- Neril acetato 25,3%;
- α -Pinene 14,5%;
- Limonene 12,3%;
- γ -Curcumene 8,7%;
- Neril propionato 6,4%;
- Nerolo 5,2%,

in accordo con i dati delle Figure 1a-1d e 2.

Dai dati di tabella 3 e delle Figure 1a-1d e 2, si rileva che la composizione dell'olio essenziale è estremamente diversa dalla composizione dell'estratto in cera di jojoba degli esempi 1, 2 e 3.

- Tabella 3 -

Composizione della frazione volatile degli estratti

DESCRIZIONE CAMPIONE	Esempio 1	Esempio 2	Esempio 3
COMPOSTI	%	%	%
beta-selinene	15,94	18,36	10,59
trans-2-decenale	11,17	16,61	17,53
alfa-selinene	11,04	12,98	7,57
AR-curcumene	9,53	12,97	7,21
nonanale	8,31	5,62	5,00
limonene	6,40	1,19	0,92
rosifoliolo	3,70	6,05	3,16
ottanale	3,60	2,65	2,31
2-etilesanolo	3,56	0,24	2,25
beta-cariofillene	2,62	2,69	1,55
trans-anetolo + 2-dodecanone	2,44	1,67	1,02
beta-himachalene	2,33	1,33	1,20
alfa-pinene	1,97	0,39	0,35
trans-2-undecenale	1,74	1,51	3,41
eptanale	1,49	0,40	1,38
nerolo	1,45	1,57	0,91
ottanolo	1,20	1,74	1,03
delta-cadinene	0,95	1,26	0,42
elemolo	0,91	0,95	0,55
trans-2-nonenale	0,67	0,33	1,32
alfa-terpineolo	0,62	1,23	0,30
tridecene	0,62	1,33	0,66
linalil acetato	0,59	0,64	0,71
carvone	0,57	0,46	0,45
4-terpineolo	0,56	0,60	0,36
trans-2-eptenale	0,55	0,23	1,38
dodecano	0,53	0,20	0,24
mentolo	0,53	0,61	0,38
canfora	0,42	0,58	0,41
decanale	0,37	0,31	0,18
gamma-terpinene	0,37	0,12	0,12
trans-2-ottenale	0,37	0,13	0,91
trans-alfa-bergamottene	0,37	0,37	0,25
2-ottanone	0,35	0,21	0,23
neril acetato	0,32	0,44	0,36
borneolo	0,31	0,27	0,38
p-cimene	0,31	0,13	0,12
2-decanone	0,26	0,27	0,24
alcol non identificato 1	<0,10	<0,10	4,33
tetradecano	0,25	0,53	0,60
isomentolo	0,17	0,21	0,24
2-eptanone	0,16	0,12	0,08
alcol non identificato 2	<0,10	<0,10	17,42

^a Risultati espressi come area % GC.

*Ing. Marco Celestino
ABM Agenzia Brevetti & Marchi
Iscritto all'albo N. 544*

5. Analisi mediante cromatografia su strato sottile degli estratti (Esempi 1 e 2)

5 E' stata eseguita un'analisi qualitativa mediante cromatografia su strato sottile (TLC) di campioni degli estratti di *Helichrysum italicum* in olio di jojoba degli esempi 1 e 2, e in altri oli, per identificare eventuali differenze.

Campioni analizzati

- I - Esempio 1 (macerazione);
- 10 - II - Esempio 2 (percolazione per gravità);
- III - Cera di jojoba da sola.

Nella Figura 3, relativa al profilo TLC, il campione I (Esempio 1) è indicato come "D", il campione II (Esempio 2) come "E", ed il campione III come "G".

15 I campioni sono stati analizzati dopo trattamento di 2 gocce di estratto con 5 gocce di metanolo, vorticando per 10 secondi e lasciando stratificare le due fasi. La fase metanolica è stata sottoposta a TLC, come indicato di seguito:

- 20 - fase stazionaria: lastre TLC Silica Gel F254, Merck, Codice 1.05554.0001;
- fasi mobili: 1) diclorometano 100%; 2) diclorometano/n-esano 50%/50%;
- deposito dei campioni: in quantità di 2 µl o di 3 µl
- 25 mediante microcapillari;
- visualizzazione delle macchie: mediante irradiazione con luce UV a 254 nm ed a 365 nm, e successivamente spruzzando la lastrina con una soluzione di vanillina al 5% in acido solforico concentrato.

Come mostra la Figura 3, è stato eseguito un confronto tra i campioni I, II e III per individuare le differenze tra percolato, macerato e cera di jojoba da sola. La presenza di una macchia 30 evidenziata nel riquadro solo nel campione II (percolato) indica che il percolato contiene un componente in concentrazioni molto superiori rispetto al macerato. Tale componente è assente nell'olio di jojoba da solo (campione III), pertanto si ritiene che provenga dall'elicriso. Tale macchia 30 è l'unica che presenta una leggera fluorescenza a 254 nm.

6. Esempi di formulazione

Formulazione Oleolito

Estratto di *Helicrysum italicum*; olio di semi di *Simmondsia Chinensis*; olio di *Anthemis Nobilis*.

Formulazione Shampoo-doccia

Acqua, Sodio cocoanfoacetato, Cocammdopropil Betaina, Acrilati C/10-30 acrilato crossipolimer, olio di semi di *Simmondsia Chinensis*, *Helicrysum italicum* estratto, olio di *Anthemis Nobilis*, Metilisotiazolinone, Metilcloroisotiazolinone, Acido Lattico, Idrossido di Sodio.

Formulazione Sapone solido

Cocos Nucifera, Acqua, *Elaeis Guinensis*, *Olea Europea*, Idrossido di Sodio, olio di semi di *Simmondsia Chinensis*, olio di *Anthemis nobilis*, *Helicrysum italicum* estratto, *Tricticum Vulgare*

Formulazione Crema viso-corpo

Acqua, *Butyrospermum parkii* (burro di Galam), Acido Stearico, Glicerina, olio di *Simmondsia Chinensis*,

estratto di *Helicrysum italicum*, dioleato di metilglucosio, trigliceride caprilico caprico, olio di castoreo idrogenato, Fenossietanolo, Paraben Metilico, Butilico, Propilico, Isopropilico, Etanolammide, Tocoferil acetato, olio di *Anthemis nobilis*.

7. Effetto degli estratti sulla proliferazione cellulare di cheratinociti dermici

Le sostanze in esame sono state valutate in un intervallo dall'1% v/v allo 0,0001% v/v.

I cheratinociti umani (HEK, Human Epidermide Keratinocyte, ECACC) sono stati fatti crescere nel terreno di coltura Complete Keratinocyte Growth Medium (ECACC) secondo le istruzioni del fornitore, e sono stati utilizzati per il saggio tra il primo e il sesto passaggio.

Il saggio è stato eseguito utilizzando il kit Cell Proliferation Reagent WST-1 di Roche Diagnostic. Il saggio è stato eseguito secondo le istruzioni del fornitore.

Più in dettaglio, le cellule sono state seminate in una piastra a 96 pozzetti per lettura in assorbanza. La densità delle cellule variava da 2.000 a 8.000 cellule per pozzetto in un volume di 100 microlitri per pozzetto. La sostanza in esame aveva una concentrazione compresa nell'intervallo sopra definito. In un controllo, alle cellule non era aggiunto alcun prodotto.

Le prove sono state eseguite in quadruplicato, inoltre è stato associato un bianco caratterizzato dal mezzo senza il prodotto da testare (controllo) e con il prodotto da testare, alla concentrazione definita sopra in singolo.

Una prima fase dell'incubazione delle cellule ha avuto la durata di 18 ore. Successivamente, è stato aggiunto il reattivo (10 µl per pozzetto) e l'incubazione è proseguita per altre 2 ore, oppure per altre 4 ore. Alla fine

*Ing. Marco Celestino
ABM Agenzia Brevetti & Marchi
Iscritto all'albo N. 544*

dell'incubazione, è stata eseguita una lettura in
assorbanza per 1 s alla lunghezza d'onda di 450 nm in un
lettore di micropiastre Victor 2 Wallac di Perkin Elmer.

I risultati sono riportati nei grafici delle Figure 4
5 e 5, in cui la proliferazione cellulare è espressa come
proliferazione percentuale (%), definita come:

$$\text{Proliferazione \%} = [(\text{assorbanza delle cellule trattate} - \text{assorbanza del bianco}) / (\text{assorbanza del controllo} - \text{assorbanza del bianco})] \times 100$$

10 Con riferimento alle Figure 4 e 5, l'estratto
dell'esempio 1, che ha dato una buona stimolazione della
proliferazione cellulare sui cheratinociti, ha un
contenuto di Crisina di 123 mg/kg di olio. Di conseguenza,
una soglia potrebbe essere $123 \times 0,65 = 80$ mg/kg di olio. In
15 modo analogo, per l'estratto dell'esempio 2 un valore di
soglia preferito potrebbe essere $130 \times 0,65 = 84$ mg/kg di
olio ed un valore ancora più preferito potrebbe essere
 $130 \times 0,80 = 104$ mg/kg di olio.

Dal grafico riportato in Figura 4 si osserva che
20 l'Esempio 3 non comporta alcuna stimolazione significativa
della proliferazione dei cheratinociti a tutte le
concentrazioni testate. Al contrario, gli Esempi 1 e 2, in
particolare quest'ultimo, stimolano la proliferazione dei
cheratinociti in modo significativamente superiore
25 rispetto al valore di controllo, almeno alle due
concentrazioni più elevate testate. A concentrazioni
inferiori, ossia operando con un estratto più diluito, i
valori di proliferazione sono simili a quelli del
controllo.

30 Come controllo si considera un valore di
proliferazione del 100%.

Il diverso comportamento dell'Esempio 3 rispetto agli
Esempi 1 e 2 può essere spiegato riferendosi alla diversa

composizione chimica, in particolare al diverso contenuto dei flavonoidi Crisina, Galangina e Pinocembrina, come riportato nelle Tabelle 2a, 2b, 2c. Il contenuto di tali flavonoidi nell'Esempio 3 è nettamente inferiore rispetto a quello degli Esempi 1 e 2.

In esperimenti indipendenti, non riportati, la cera di jojoba non ha mostrato alcuna influenza significativa sulla proliferazione cellulare dei cheratinociti. Quindi l'effetto sui cheratinociti dipende dall'elicriso e non dalla jojoba.

Nel grafico di Figura 5 vengono mostrate tutte le correlazioni positive tra le quantità dei composti determinati nei campioni degli estratti degli esempi 1, 2 e 3, e la percentuale di proliferazione su cellule HEK con estratto alla concentrazione dell'1%. Tali risultati sono riportati anche in Tabella 4.

- Tabella 4 -

<u>Campione</u>	<u>Crescita % con estratto</u> <u>alla concentrazione dell'1%</u>	<u>SEM</u>
Esempio 3	111	6
Esempio 2	188	3
Olio essenziale	-2	1
Esempio 1	146	8

Si può osservare che tali correlazioni positive si hanno per i tre flavonoidi Galangina, Pinocembrina e Crisina, per i terpeni α -selinene e β -selinene e per il curcumene. Al contrario, non si sono trovate correlazioni positive per le aldeidi.

p.p. Simone DEL CORSO

RIVENDICAZIONI

1. Un metodo per preparare un estratto di un *Helichrysum* in olio di jojoba, detto metodo comprendendo le fasi di:
- 5 - predisposizione di una parte della pianta scelta tra le parti aree superiori della pianta, in particolare le sommità fiorite;
- predisposizione di un olio di jojoba avente un numero acido superiore a 0,3;
- 10 - contatto di detta parte di detta pianta di *Helichrysum italicum* con detto olio di jojoba in condizioni di estrazione;
- recupero di detto estratto ottenuto in detta fase di contatto,
- 15 in particolare detto estratto presentando un contenuto di Crisina per kg di acidi grassi a 20 atomi di carbonio aventi una sola insaturazione superiore a 80 mg e/o detto estratto comprendendo limonene e β -selinene aventi un rapporto in peso di limonene
- 20 rispetto a detto β -selinene inferiore a 0,4,
- in particolare, detta pianta del genere *Helichrysum* appartiene ad una specie scelta tra:
- *Helichrysum italicum*, in particolare *Helichrysum italicum* subspecie *italicum* e/o *Helichrysum italicum* subspecie *microphyllum*;
- 25 - *Helichrysum stoechas*;
- *Helichrysum arenarium*.
2. Un metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto olio di jojoba ha un numero acido superiore a 0,32,
- 30 più in particolare un numero acido superiore a 0,36.
3. Un estratto in olio di jojoba ottenuto da una pianta del genere *Helichrysum*, detto olio di jojoba

comprendendo acidi grassi a 20 atomi di carbonio aventi una sola insaturazione, detto estratto comprendendo un predeterminato contenuto di Crisina

5 **caratterizzato dal fatto che**

detto contenuto di Crisina, per kg di acidi grassi a 20 atomi di carbonio aventi una sola insaturazione è superiore a 80 mg.

10 4. Un estratto come da rivendicazione 3, in cui detto contenuto di Crisina è superiore a 84 mg per kg di acidi grassi a 20 atomi di carbonio con una sola insaturazione, più in particolare detto contenuto di Crisina è superiore a 104 mg/kg di acidi grassi a 20 atomi di carbonio con una sola insaturazione.

15 5. Un estratto in olio di jojoba ottenuto da una pianta del genere Helichrysum in olio di jojoba, detto estratto comprendendo limonene e β -selinene

caratterizzato dal fatto che

20 detto limonene ha un rapporto in peso rispetto a detto β -selinene inferiore a 0,4.

6. Un estratto come da rivendicazione 5, in cui detto rapporto in peso è inferiore a 0,08, in particolare detto rapporto in peso è inferiore a 0,06.

25 7. Un metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detta fase di contatto viene eseguita con una tecnica di percolazione o di macerazione, preferibilmente di percolazione,

30 in particolare detta fase di contatto viene eseguita mantenendo detto olio di jojoba a una temperatura di contatto compresa tra 25°C e 90°C, più in particolare tra 50°C e 85°C, ancora più in particolare tra 70°C e 80°C,

in particolare detta fase di predisposizione di una parte di detta pianta comprende una fase di essiccamento di detta parte di detta pianta.

8. Una composizione medicale o cosmetica comprendente un estratto come da una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 3 alla 6, e/o un estratto ottenuto con il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1,2 e 7, per il trattamento e/o la prevenzione di una malattia e/o di una condizione per cui è richiesta una stimolazione della proliferazione cellulare dei cheratinociti, detta malattia e/o condizione essendo scelta tra:

- ferite, in particolare tagli, escoriazioni, abrasioni, punture di insetti, ferite da arma da taglio, ferite da arma da fuoco, ferite chirurgiche;

- ustioni, in particolare ustioni da radiazione ultravioletta, ustioni solari, ustioni da radioterapia, ustioni da fiamma viva, ustioni da contatto con corpi caldi, ustioni da sostanze acide, ustioni da sostanze caustiche;

- ulcere cutanee, in particolare piaghe da decubito, piaghe dovute a diabete;

- cicatrici, in particolare cicatrici post-operatorie, cicatrici dovute ad accumulo eccessivo di tessuto connettivo a seguito di un danno tissutale, cicatrici atrofiche, cicatrici da acne;

- invecchiamento cutaneo, in particolare invecchiamento dovuto all'età, invecchiamento dovuto a radiazione ultravioletta, invecchiamento dovuto a inquinamento ambientale, invecchiamento dovuto a fattori atmosferici, invecchiamento dovuto a fattori ormonali;

- smagliature, in particolare smagliature dovute a gravidanza, smagliature dovute a marcate variazioni di peso corporeo, smagliature dovute a fattori ormonali;
 - 5 - rughe, in particolare rughe d'espressione.
9. Una composizione come da rivendicazione 8, comprendente un olio essenziale, in particolare detto olio essenziale essendo scelto tra: olio essenziale di camomilla romana; olio essenziale di camomilla
- 10 matricaria; olio essenziale di garofano; olio essenziale di tea tree; olio essenziale di lavanda; olio essenziale di origano, o loro miscele.
10. Una composizione repellente gli insetti comprendente un estratto come da una qualsiasi delle rivendicazioni
- 15 dalla 3 alla 6, e/o un estratto ottenuto con un metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1,2 e 7.

p.p. Simone DEL CORSO

CLAIMS

1. A method for preparing a Jojoba oil Helichrysum extract, said method comprising the steps of:

- 5 - prearranging a plant portion selected among the plant upper parts, in particular among the flowers;
- prearranging a jojoba wax having an acid number higher than 0,3;
- 10 - contacting said part of said plant portion with said jojoba wax under an extraction condition;
- recovering said extract obtained during said step of contacting,

in particolare detto estratto presentando un contenuto di Crisina per kg di acidi grassi a 20 atomi di carbonio aventi una sola insaturazione superiore a 80

15 mg e/o detto estratto comprendendo limonene e β -selinene aventi un rapporto in peso di limonene rispetto a detto 1 β -selinene inferiore a 0,4,

in particular, said Helichrysum belongs to a species selected from the group comprised of:

20

- Helichrysum italicum, in particular Helichrysum italicum subspecie italicum and/or Helichrysum italicum subspecie microphyllum;
- Helichrysum stoechas;
- 25 - Helichrysum arenarium.

2. A method according to claim 1, wherein said jojoba wax has an acid number higher than 0,32, more in particular, an acid number higher than 0,36.

3. A Jojoba oil Helichrysum extract, said jojoba oil comprising fatty acids with 20 carbon atoms and one

30 unsaturation

said extract comprising a predetermined content of Chrysin,

characterised in that

said content of Chrysin, per kg of fatty acids with 20 carbon atoms and one unsaturation, is higher than 80 mg,

4. An extract according to claim 3, wherein said content of Chrysin is higher than 84 mg per kg of fatty acids with 20 carbon atoms and one unsaturation, more in particular, said content of Chrysin is higher than 104 mg/kg of fatty acids with 20 carbon atoms and one unsaturation.

5. A Jojoba oil Helichrysum extract, said extract comprising Limonene and β -selinene

characterised in that

said limonene has a weight ratio to said β -selinene lower than 0.4,

6. An extract according to claim 5, wherein said weight ratio is lower than 0.08, more in particular said weight ratio is lower than 0.06.

7. A method according to claim 1, wherein said step of contacting is carried out by a percolation technique or by a maceration technique, preferably by a percolation technique,

in particular said step of contacting is carried out by maintaining said jojoba oil at a contact temperature set between 25°C and 90°C, more in particular between 50°C and 85°C, even more in particular between 70°C and 80°C.

in particular, said step of prearranging a plant portion comprises a step of drying said plant portion.

8. A medical or cosmetic composition comprising an extract according to any of claims 3 to 6, and/or an extract obtained by the method according to any of claims 1,2 and 7, for treating and/or preventing a disease and/or a condition that takes advantage from a cheratinocytes growth stimulation, said disease and/or condition selected from the group comprised of:

- wounds, in particular skin cuts, excoriations, abrasions, insect bites, cutting-arm injuries, fire-arm injuries, surgical wounds;
- burns, in particular UV burns, sun burns, radiotherapy burns, fire burns, burns caused by contact with hot bodies, acid burns, caustic burns;
- skin ulcers, in particular decubitus ulcers, diabetic ulcers;
- scars, in particular surgical scars, scars due to excessive tissue growth after a tissue injury, scars atrophic scars, acne scars;
- skin aging, in particular age skin aging, UV skin aging, environmental pollution skin aging, skin aging due to exposition to an open environment, hormonal skin aging;
- stretch marks, in particular pregnancy stretch marks, important weight change stretch marks, hormonal stretch marks;
- wrinkles, in particular expression wrinkles.

9. A composition according to claim 8, comprising an essential oil, in particular said essential oil selected from the group comprised of: roman camomile essential oil; matricaria camomile essential oil; carnation essential oil; tea tree essential oil;

lavender essential oil; origanum essential oil, or mixtures thereof.

- 5 **10.** An insect-repulsive composition comprising an extract according to any of claims 3 to 6, and/or an extract obtained by the method according to any of claims 1,2 and 7.

Fig. 1a

3 oct. 2010

FICHE D'ANALYSE

Nom botanique : ----- HELICHRYSUM ITALICUM

Nom commun : ----- HELICHRYSUM D'ITALIE

Numéro du lot : ----- 02-AZEO 2010

Origine : ----- SARDAIGNE AZ.AGR.ERBORISTERIA OFFICINALE

Partie de la plante : ----- SOMMITÉ FLEURIE

Caractéristiques d'analyse :

CPG 5890 / MS 5970 - Colonne : HP INNOWAX polaire : 60 m × 0,25 mm × 0,5 µm

CPG 5890 FID - Colonne : HP INNOWAX polaire : 60 m × 0,25 mm × 0,5 µm

Programmation de température : 6 mn à 50 °C - 2 °C/mn → 250 °C - 20mn à 250 °C.

Gaz vecteur He : 30 psis/FID, 23 psis/MS. Injecteur : split. Echantillon : 1 µl de 5% de solution dans l'Hexane.

Gamme de masse : 30 à 350. Les composés des huiles essentielles sont identifiés par une recherche combinée des spectres de masse (bibliothèque NIST 75 KL et bibliothèque personnelle) et des temps de rétention.

Les % sont calculés à partir des surfaces de pics donnés par le GC/FID sans l'utilisation de facteur de correction

Profil CHROMATOGRAPHIQUE

20.00 40.00 60.00 80.00 100.00

0

500000

1000000

1500000

2000000

2500000

3000000

3500000

4000000

4500000

Time-->

Abundance

TIC: HIL10086.D

Tableau de résultats I : HELICHRYSUM D'Italie

Pics Temps de

rétention

Constituants %

1 7,6 3-METHYL-CYCLOHEXANONE 0,04

2 15,4 α-PINENE 0,21

3 17,8 α-FENCHENE 0,15

4 18,4 CAMPHENE 0,03

5 19,0 4-METHYL-3-HEXANONE 0,02

6 21,1 β-PINENE 0,06

7 22,1 SABINENE 0,01

8 25,1 β-MYRCENE 0,01

9 25,9 2-METHYLBUTYRATE D'ISOBUTYLE 0,02

10 27,1 ISOBUTYRATE D'ISOAMYLE 0,05

11 28,2 LIMONENE 1,5/

12 29,0 1,8-CINEOLE 0,99

13 31,9 γ-TERPINENE 0,10

14 32,1 Trans-β-OCIMENE 0,02

15 33,7 p-CYMENE 0,09

16 34,0 2-METHYLBUTYRATE DE 2-METHYLBUTYLE 0,05

17 34,6 TERPINOLENE 0,04

18 34,8 ANGELATE D'ISOBUTYLE 0,22

19 35,2 3-METHYLBUTYRATE DE 3-METHYLBUTYLE 0,08

Fig. 1b

20 42,5 2-HEPTANONE 0,06
21 42,8 ANGELATE D'ISOAMYLE 0,76
22 47,6 ESTER ANGELIQUE 0,05
23 48,3 SESQUITERPENE 0,07
24 49,6 YLANGENE 0,07
25 50,1 SESQUITERPENE 0,03
26 50,3 α -COPAENE 1,22
27 50,9 ISOITALICENE 1,96
28 53,1 α -GURJUNENE 0,13
29 53,3 LINALOL 2,45
30 51,7 ITALICENE 6,71
31 54,9 α -CEDRENE 0,05
32 55,4 ITALICENE ISOMERE 0,20
33 55,5 α -cis-BERGAMOTENE 2,25
34 56,8 α -trans-BERGAMOTENE 1,26
35 57,2 β -ELEMENE 0,13
36 57,3 2-UNDECANONE 0,04
37 57,5 3,5-DIMETHYLOCTAN-4,6-DIONE Mw=170 0,04
38 57,8 TERPINENE-4-OL 0,18
39 57,9 β -CARYOPHYLLENE 1,14
40 58,3 β -GUAIADIENE 0,14
41 58,6 AROMADENDRENE 0,33
42 59,4 GURJUNENE ISOMERE 0,14
43 60,1 β -SANTALENE 0,03

Tableau de résultats 2 : HELICHRYSE D'Italie

Numéro du lot :----- 02-AZEO 2010

Origine :----- SARDAIGNE AZ.AGR.ERBORISTERIA OFFICINALE

Pics Temps de
rétention

Constituants %

44 60,4 SESQUITERPENE 0,03
45 61,2 ALLO-AROMADENDRENE 2,73
46 61,6 E- β -FARNESENE 0,22
47 62,0 β -CADINENE 0,26
48 62,2 SESQUITERPENE 0,05
49 62,8 α -HUMULENE 0,16
50 63,0 ISOACORADIENE 0,88
51 63,3 CURCUMENE ISOMERE 0,76
52 63,5 Z- β -FARNESENE 0,24
53 63,8 γ -CURCUMENE + γ -MUUROLENE 19,05
54 64,1 ESTER ANGELIQUE 0,14
55 64,2 SESQUITERPENE 0,27
56 64,3 LEDENE 0,27
57 65,3 GERMACRENE D 0,36
58 65,6 ACETATE DE NERYLE 1,69
59 65,7 CADINENE ISOMERE 0,12
60 65,9 α -BISABOLENE 0,38
61 66,1 α -MUUROLENE 1,85
62 66,2 β -SELINENE 0,85
63 66,4 α -SELINENE 0,84
64 66,8 β -CURCUMENE 0,53
65 66,9 ALCOOL DIENIQUE 0,88
66 67,1 SESQUITERPENE OXYGÉNÉ 0,02
67 67,9 α -FARNESENE ISOMERE 0,20
68 68,3 δ -CADINENE 5,49
69 68,6 γ -CADINENE 4,04
70 68,9 α -BISABOLENE 0,15
71 69,0 α -CURCUMENE 9,97
72 69,4 PROPIONATE DE NERYLE 0,91
73 69,9 CADINA-1,4-DIENE 0,42
74 70,0 NEROL 0,43
75 70,5 α -AMORPHENE 0,58

- 3/6 -

Fig. 1c

76 72,6 Trans-CARVEOL 0,03
77 73,1 CALAMENENE 0,47
78 73,5 COMPOSÉ OXYGÉNÉ 0,10
79 73,6 BUTYRATE DE NERYLE 0,03
80 74,8 ISOBUTYRATE DE NERYLE 0,41
81 75,3 COMPOSÉ AROMATIQUE 0,10
82 75,7 ITALIDIONE I Mw=210 0,06
83 75,9 ITALIDIONE II Mw=224 0,04
84 76,7 COMPOSÉ AROMATIQUE 0,04
85 78,1 CALACORENE 0,17
86 78,8 PALUSTROL 0,13
Tableau de résultats 3 : HELICHRYSSE D'Italie
Numéro du lot :----- 02-AZEO 2010

Pics Temps de
rétention

Constituants %

87 79,9 COMPOSÉ AROMATIQUE 0,05
88 80,4 ITALIDIONE III 0,04
89 80,6 VALERATE DE NERYLE 0,03
90 81,8 ESTER AROMATIQUE 0,13
91 82,1 ESTER AROMATIQUE 0,03
92 83,1 DIONE DÉRIVÉE 0,03
93 83,6 NEROLIDOL 0,23
94 84,1 SESQUITERPENOL Mw=222 0,10
95 84,4 LEDOL 0,52
96 85,8 EPI-CUBENOL 0,20
97 86,2 CUBENOL 0,27
98 86,3 EPOXYDE SESQUITERPENIQUE Mw=220 0,07
99 86,7 GLOBULOL 0,06
100 87,1 GUAJOL 1,62
101 88,0 COMPOSÉ AROMATIQUE 0,18
102 88,4 TRIMETHYL-PENTADECANONE 0,13
103 89,3 EUDESMA-5-EN-11- α -OL 10,31
104 90,4 COMPOSÉ AROMATIQUE 0,14
105 90,6 SESQUITERPENOL Mw=220 0,45
106 91,2 γ -EUDESMOL 0,90
107 91,6 EUDESMOL ISOMERE 1,00
108 92,1 SESQUITERPENOL Mw=222 0,08
109 92,4 α -MUUROL 0,24
110 92,6 SESQUITERPENOL Mw=222 0,16
111 92,8 CADINOL ISOMERE 0,12
112 93,2 EUDESMOL ISOMERE 0,45
113 93,6 BULNESOL ISOMERE 0,48
114 94,4 α -EUDESMOL 0,28
115 94,7 α -CADINOL 0,37
116 94,9 β -EUDESMOL 0,49
117 95,2 DITERPENE Mw=272 0,05
118 95,7 DIONE ALIPHATIQUE + ACIDE CAPRIQUE 0,19
119 96,0 SESQUITERPENOL Mw=222 0,10
120 96,5 DIONE ALIPHATIQUE 0,09
121 97,9 SESQUITERPENOL 0,08
122 101,1 DIONE ALIPHATIQUE 0,16
123 101,9 COMPOSÉ AROMATIQUE 0,06
124 102,0 COMPOSÉ AROMATIQUE ISOMERE 0,06
125 104,3 DIONE ALIPHATIQUE 0,05
126 104,7 DIONE ALIPHATIQUE 0,04
127 112,9 DIONE ALIPHATIQUE 0,18
128 113,0 DIONE ALIPHATIQUE 0,23
TOTAL 100,00

*Ing. Marco Celestino
ABM Agenzia Brevetti & Marchi
Iscritto all'albo N. 544*

Fig. 1d

Caratteristiche d'analisi :

CPG 5890 / MS 5970 - Colonne : HP 5-MSNOWAX polaire : 60 m x 0,25 mm x 0,5 µm

CPG 5890 FID - Colonne : HP INNOWAX polaire : 60 m x 0,25 mm x 0,5 µm

Programmation de température : 6 mn à 50 °C - 2 °C/mn → 250 °C - 20 mn à 250 °C.

Gaz vecteur He : 30 psis/FID, 23 psis/MS. Injecteur : split. Echantillon : 1 µl de 5% de solution dans l'Hexane.

Gamme de masse : 30 à 350. Les composés des huiles essentielles sont identifiés par une recherche combinée des spectres de masse (bibliothèque NIST 75 KL et bibliothèque personnelle) et des temps de rétention.

Les % sont calculés à partir des surfaces de pics données par le GC/FID sans l'utilisation de facteur de correction

Fig. 2

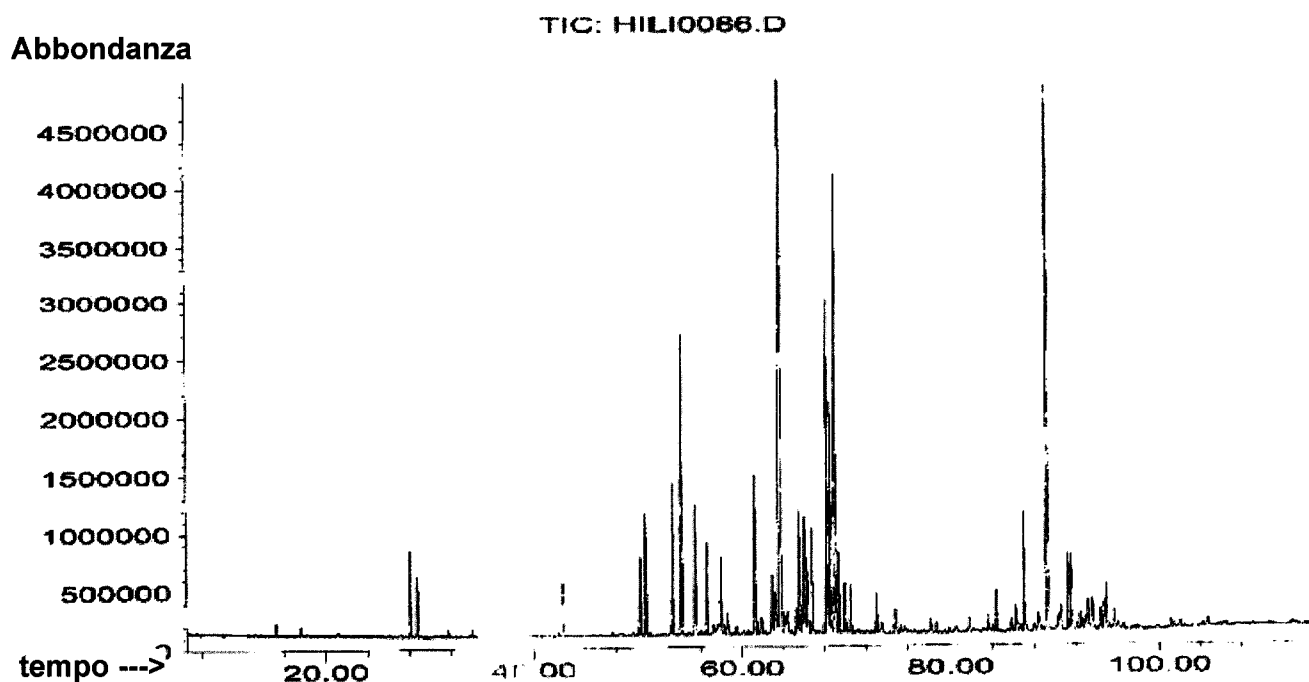


Fig. 3

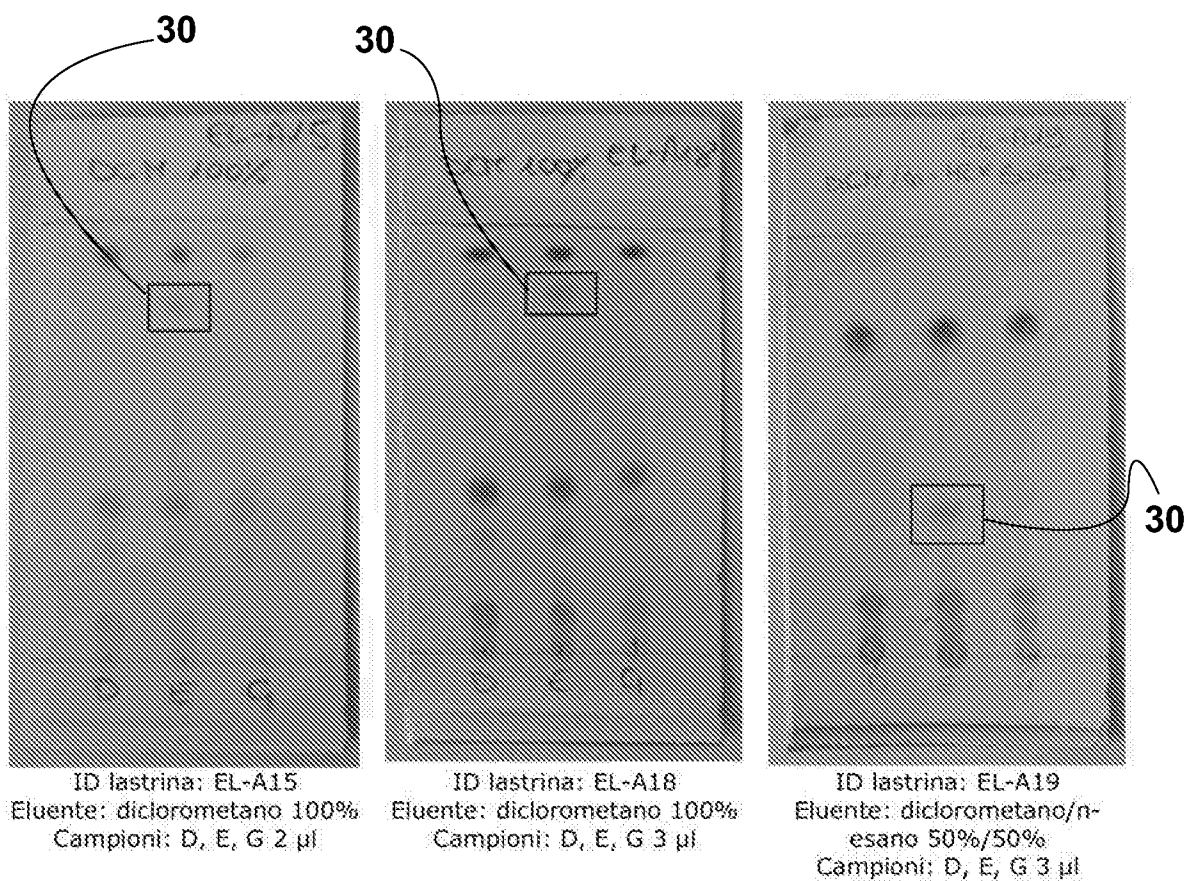


Fig. 4

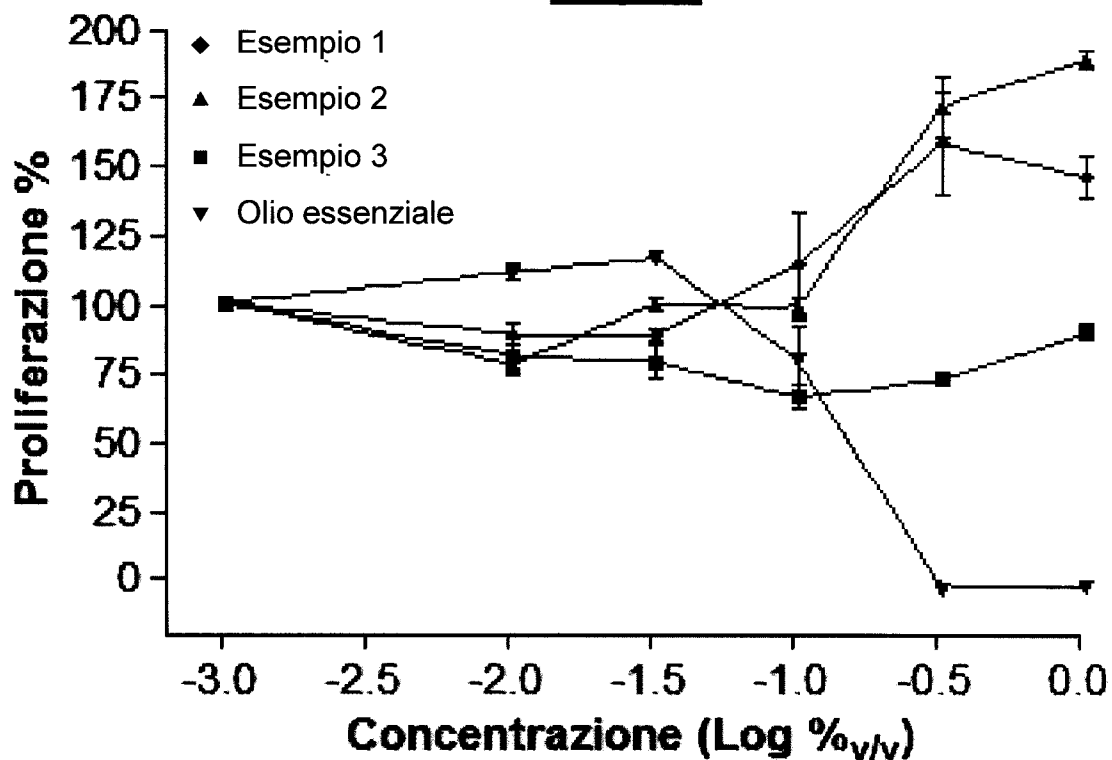


Fig. 5

