



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

<b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b>	<b>102019000009558</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>20/06/2019</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>20/12/2020</b>

Classifiche IPC

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
A	61	K	8	9783

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
A	61	Q	19	08

Titolo

Uso cosmetico di estratti derivati da colture di cellule vegetali appartenenti alla specie *Pelargonium capitatum* e composizioni cosmetiche che contengono tali estratti

## DESCRIZIONE

### Campo di applicazione

La presente invenzione si riferisce all'uso in campo cosmetico di estratti derivati da colture di cellule vegetali del genere *Pelargonium*,  
5 al metodo per la produzione di detti estratti e alle relative composizioni comprendenti tali estratti per l'uso in dermocosmesi.

### Tecnica nota

L'invecchiamento cutaneo, oltre che causato da fattori endogeni, è principalmente provocato da fattori ambientali esterni, come  
10 il fumo, sostanze inquinanti e radiazioni elettromagnetiche che fanno parte della luce solare.

Benché siano già noti gli effetti delle radiazioni UV sulla pelle (Natarajan et al., 2014), meno noti sono i danni che altri tipi di radiazioni possono causare ai tessuti della pelle, come i raggi infrarossi  
15 (IR) e la luce blu (BL).

I raggi infrarossi rappresentano una parte dell'intero spettro della radiazione elettromagnetica del sole: il termine stesso "infrarosso", cioè inferiore del rosso, sta ad indicare che la loro frequenza si trova immediatamente sotto quella del colore rosso della luce visibile. Spesso i  
20 raggi infrarossi vengono indicati come "radiazioni termiche" o "radiazioni di calore", proprio per la loro intrinseca capacità di scaldare le superfici che colpiscono. Sulla base della specifica lunghezza d'onda, essi sono a loro volta suddivisi in lunghi, medi e corti. I raggi infrarossi lunghi sono quelli più utilizzati in campo medico, in quanto sono stati  
25 dimostrati degli effetti benefici su diversi organi umani e sono stati

spesso utilizzati per terapie di riabilitazione. Nonostante i suddetti effetti positivi, è stato evidenziato da diversi studi che tali raggi possono produrre degli effetti dannosi sulla pelle, se irradiata per tempi lunghi o sottoposta ad alte intensità.

5           In particolare, i raggi infrarossi inducono la produzione delle metallo-proteinasi (MMPs), enzimi che costituiscono una famiglia di endo-peptidasi dipendenti da calcio e che sono responsabili della digestione delle proteine della matrice extracellulare, come collagene, gelatina e stromielina. Tra le MMPs, le più importanti sono le MMP-1 e -  
10   3 che vengono definite collagenasi in quanto entrambe sono capaci di degradare diversi tipi di collagene (Barolet et al., 2016). La conseguenza è la perdita da parte della pelle di elasticità e resistenza, mentre si assiste ad un graduale indebolimento generale e ad un precoce invecchiamento.

15           A livello cellulare, i raggi infrarossi causano un significativo incremento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), in particolare all'interno dei mitocondri, compromettendo le funzioni stesse di tali organelli, come quelle respiratorie e di produzione di ATP (Schroeder et al., 2006). Inoltre, un altro effetto dannoso causato da IR sulla pelle è  
20   l'insorgenza di reazioni infiammatorie, causate da una iperproduzione di citochine infiammatorie, come l'interleuchina 6 (IL-6), a sua volta mediata dall'attivazione del recettore TRPV-1, un fattore coinvolto nell'iper-sensibilità ed iper-reattività della pelle a stress esterni di varia natura (Hsu & Yoshioka, 2015).

25           Anche la luce blu (BL) è una componente naturale della

radiazione solare; infatti fa parte dello spettro di luce visibile ed è caratterizzata da una lunghezza d'onda più lunga rispetto agli UV.

La maggior parte degli apparecchi tecnologici, come LED, smartphone e schermi digitali, emanano importanti quantità di luce blu, la cui intensità arriva fino a 1000 volte superiore rispetto a quella contenuta nella luce visibile solare. Nonostante la luce blu sia meno pericolosa degli UV, la sua esposizione è sicuramente più frequente e costante e, in tempi più lunghi, può produrre danni significativi alla pelle. Considerando che, attualmente, una persona possiede in media quattro dispositivi elettronici a cui è esposta per un tempo di circa sei ore al giorno, in soli 4 giorni si raggiungerebbe l'esposizione ad un'energia equivalente a 20 minuti di sole di mezzogiorno. E' stato infatti dimostrato che la luce blu causa dei danni significativi alla pelle, in quanto determina una iperproduzione di ROS nelle cellule (Nakashima et al., 2017).

Ad oggi esistono in commercio alcuni prodotti cosmetici in grado di agire come filtro solare dei raggi UV, delle radiazioni infrarosse e della luce blu.

È noto che i filtri solari sono sostanze costituite da molecole che riescono a riflettere ed assorbire le radiazioni, per poi rilasciarle sotto forma di calore, quindi raggi infrarossi. Pertanto, se da un lato il filtro solare evita che la pelle assorba troppi UV, dall'altro può determinare un ulteriore danno alle cellule degli strati più profondi a causa di una maggiore quantità di radiazioni infrarosse prodotte. Inoltre, i filtri solari possono essere instabili, irritanti, e non

completamente efficaci per ogni tipo di radiazione e, soprattutto, non riparano i danni che le radiazioni stesse causano alle cellule della pelle e alle loro strutture subcellulari.

Il problema tecnico alla base della presente invenzione è quello di mettere a disposizione nuove composizioni cosmetiche da impiegarsi vantaggiosamente per il trattamento e la prevenzione del foto-invecchiamento cutaneo indotto da raggi infrarossi, o da luce blu o luce ultravioletta, garantendo un'efficacia ad ampio spettro.

#### Sommario dell'invenzione

Gli autori della presente invenzione hanno ora individuato un estratto derivato da cellule in coltura della pianta *Pelargonium capitatum*, in grado di proteggere le cellule della pelle dai danni causati dalle radiazioni nell'infrarosso, dalla luce blu e dalle radiazioni ultraviolette.

In un suo aspetto, la presente invenzione si riferisce dunque all'uso cosmetico di almeno un estratto derivato da colture di cellule vegetali appartenenti alla specie *Pelargonium capitatum* per il trattamento e/o la prevenzione del foto-invecchiamento della pelle dovuto a esposizione a luce ultravioletta, luce blu o radiazione infrarossa.

Con l'espressione "luce blu", come qui utilizzata, si intende una radiazione elettromagnetica di lunghezza d'onda compresa tra 380 nm e 500 nm.

Le piante del genere *Pelargonium*, appartenente alla famiglia delle geraniacee a cui fa parte il geranio comune, danno origine a

estratti che sono particolarmente ricchi di molecole ad azione antiossidante, come polifenoli, tannini e flavonoli.

Allo scopo di sviluppare un prodotto per la cura della pelle contenente un estratto derivato da *Pelargonium capitatum*, da utilizzare  
5 per contrastare i danni da foto-invecchiamento (detto “photo-aging”) in applicazioni cosmetiche, gli autori hanno allestito colture cellulari liquide a partire da foglie di *Pelargonium capitatum*.

Con il termine “foto-invecchiamento”, come qui utilizzato, si intende l’invecchiamento della pelle dovuto all’esposizione alle  
10 radiazioni elettromagnetiche, sia nello spettro della radiazione ultravioletta (UV) sia nello spettro del visibile.

Dopo aver ottenuto le cellule indifferenziate in forma di “callo” da tessuti fogliari, sono state sviluppate colture di cellule dense, le quali sono state processate al fine di ottenere estratti idrosolubili.

15 L’utilizzo di estratti derivati da cellule in coltura, invece che dalla pianta o da alcuni suoi organi, comporta vantaggi molteplici.

Innanzitutto, gli estratti ottenuti dalle cellule in coltura sono privi di sostanze contaminanti potenzialmente tossiche (come pesticidi e fertilizzanti) e agenti patogeni ambientali a cui sono esposte le piante  
20 durante la loro crescita. Le cellule in coltura, infatti, crescono in condizioni controllate di laboratorio.

Inoltre, le caratteristiche degli estratti ottenuti da cellule in coltura sono standardizzate, e non dipendono dalle stagioni, condizioni ambientali e ritmi circadiani come quelli a cui sono sottoposte le piante;  
25 ciò garantisce il mantenimento delle medesime caratteristiche di qualità

del prodotto ottenuto.

Un ulteriore vantaggio è rappresentato dal fatto che le cellule in coltura sono totipotenti e nello stesso tempo estremamente versatili, perché possono essere manipolate con facilità ed indotte a produrre una  
5 maggiore quantità di sostanze desiderate, semplicemente cambiando le condizioni di crescita o aggiungendo sostanze naturali con azione stimolante.

Inoltre, gli estratti ottenuti dalle cellule in coltura sono privi di sostanze irritanti o potenzialmente allergeniche, e pertanto il rischio di  
10 sviluppare allergie sulla pelle in seguito ad applicazione è sensibilmente ridotto.

I suddetti vantaggi rendono le cellule vegetali in coltura una conveniente fonte di composti benefici, e possono quindi essere utilizzate come biofabbriche di principi attivi per combattere  
15 l'invecchiamento cutaneo.

In un altro suo aspetto, la presente invenzione riguarda un procedimento per la preparazione di almeno un estratto da colture di cellule vegetali appartenenti alla specie *Pelargonium capitatum*, comprendente le fasi di:

- 20 a) coltivare dette cellule di *Pelargonium capitatum* in un mezzo di coltura liquido;
- b) omogeneizzare le cellule in una soluzione acquosa salina, ottenendo un omogenato;
- c) separare la parte solida di detto omogenato dalla parte  
25 liquida, che costituisce un estratto idrosolubile.

Con l'espressione "cellule vegetali di *Pelargonium*", come qui utilizzata, si intendono cellule totipotenti derivate dalla proliferazione di cellule prelevate da diversi tessuti della pianta (preferibilmente da cellule della foglia).

5 Le suddette colture di cellule vegetali sono ottenute prelevando tessuto vegetale da piante, inducendo la formazione di calli dal tessuto su un substrato solido, prelevando i calli e allestendo colture liquide da essi.

La suddetta soluzione acquosa salina è generalmente una  
10 soluzione tamponata, ad esempio un tampone salino fosfato PBS a pH 7,4.

Preferibilmente la suddetta fase c) di separare la parte solida dell'omogenato dalla parte liquida è eseguita mediante centrifugazione, sedimentazione o filtrazione, e porta alla separazione di un  
15 sopranatante (parte liquida) e di un pellet (parte solida).

Il procedimento secondo l'invenzione può inoltre comprendere la fase ulteriore di trattare la suddetta parte solida con un solvente lipofilo, ottenendo un estratto liposolubile.

Il suddetto solvente lipofilo è un solvente organico  
20 preferibilmente scelto tra alcoli, acetone, etere, steroli e oli e convenientemente costituito da un alcool a 2-4 atomi di carbonio, vantaggiosamente etanolo.

Alternativamente, il procedimento secondo l'invenzione può comprendere la fase ulteriore di trattare la suddetta parte solida con  
25 acidi ed enzimi proteolitici in soluzione acquosa, così da idrolizzare le

proteine delle pareti cellulari, ottenendo un estratto ricco in peptidi e zuccheri.

Preferibilmente la suddetta parte solida viene previamente trattata con acqua distillata in modo da rimuovere i residui dei componenti citoplasmatici e poi trattata con soluzione acida per l'idrolisi dei legami glucosidici, e con enzimi per idrolizzare le proteine delle pareti cellulari.

Preferibilmente, successivamente al trattamento con acqua distillata e prima del trattamento con soluzione acida, la parte solida viene trattata con una soluzione di EDTA (ad es. 2mM) e portata all'ebollizione.

Gli estratti summenzionati (estratto idrosolubile, estratto liposolubile ed estratto ricco in peptidi e zuccheri) possono essere portati a secco con metodiche note (utilizzando ad esempio un liofilizzatore, un evaporatore rotante o un essiccatore spray), ottenendo, a seconda dei casi, una polvere o una pasta semisolida.

In un suo ulteriore aspetto, la presente invenzione si riferisce all'uso cosmetico come più sopra definito, in cui il suddetto almeno un estratto è scelto tra l'estratto idrosolubile, l'estratto liposolubile oppure l'estratto ricco in peptidi e zuccheri, come ottenuti mediante il procedimento sopra descritto o è una miscela di due di tali estratti o di tutti e tre.

Preferibilmente per l'uso cosmetico in questione, il suddetto almeno un estratto comprende almeno due degli estratti summenzionati e preferibilmente tutti e tre.

In un suo ulteriore aspetto, la presente invenzione riguarda una composizione comprendente l'estratto idrosolubile e/o l'estratto liposolubile e/o l'estratto ricco in peptidi e zuccheri ottenuti mediante il metodo summenzionato.

5 Preferibilmente, la composizione contiene, per una parte in peso dell'estratto idrosolubile, da 0,01 a 100, preferibilmente 1, parti in peso dell'estratto liposolubile e, indipendentemente, da 0,01 a 100, preferibilmente 1, parti in peso dell'estratto ricco in peptidi e zuccheri.

10 Preferibilmente, la composizione contiene, per una parte in peso dell'estratto idrosolubile, una parte in peso dell'estratto liposolubile e una parte in peso dell'estratto ricco in peptidi e zuccheri.

15 In maniera preferita, la suddetta composizione comprende almeno un solvente idrofilo scelto dal gruppo comprendente acqua, soluzioni acquose saline, e solventi organici, preferibilmente oli, alcoli, glicerolo, acidi organici, ammidi, ammine, aldeidi e chetoni.

Preferibilmente, il solvente idrofilo è una soluzione idroalcolica, convenientemente una miscela acqua/glicerina, e l'estratto idrosolubile è contenuto in una concentrazione di 0,1-12%, preferibilmente 0,4-5%, in peso sul peso della composizione.

20 Le composizioni cosmetiche a base di questo estratto hanno mostrato un effetto di protezione delle cellule della pelle dai danni indotti da IR (quali aumento del livello dei ROS mitocondriali, riduzione della produzione di ATP, aumento della produzione di MMP-1 e insorgenza di reazioni infiammatorie), da luce blu (come aumento del  
25 livello di ROS citosolici) e infine protezione da morte cellulare indotta da

UV.

Quindi, la presente invenzione si riferisce anche all'uso cosmetico della composizione sopra descritta per il trattamento e la prevenzione del foto-invecchiamento della pelle dovuto all'esposizione a luce blu, luce ultravioletta o radiazioni infrarosse.

Infine, la presente invenzione si riferisce ad una formulazione cosmetica comprendente uno degli estratti sopra descritti (estratto idrosolubile, estratto liposolubile, estratto ricco in peptidi e zuccheri) o una composizione come sopra definita e un veicolo cosmeticamente accettabile. Tale formulazione cosmetica può essere ad esempio in forma di crema, gel, lozione per applicazione cutanea, rossetto, fondotinta e make-up.

#### **Breve descrizione delle figure**

La figura 1 mostra il contenuto di ROS mitocondriali in fibroblasti umani adulti (HDF) in seguito al trattamento con IR (44J/cm<sup>2</sup>) e l'effetto di riduzione esercitato dall'estratto di Pelargonium, usato a 2 diverse concentrazioni. Come controllo positivo è stato usato il Coenzima Q, noto per la sua elevata azione anti-ossidante. Le barre rappresentano le deviazioni standard.

La figura 2 mostra la quantità di ATP prodotta dai fibroblasti umani HDF in seguito al trattamento con IR (44J/cm<sup>2</sup>) e l'effetto di recupero esercitato dall'estratto di Pelargonium, usato a 2 diverse concentrazioni. Le barre rappresentano le deviazioni standard, mentre gli asterischi indicano differenze significative rispetto al controllo.

La figura 3 mostra la misura della quantità di metallo-

proteinasasi 1 (MMP1) prodotta dai fibroblasti umani HDF in seguito al trattamento con IR (88J/cm<sup>2</sup>) e l'effetto di inibizione esercitato dall'estratto di Pelargonium, usato a 2 diverse concentrazioni. Come controllo positivo è stato usato l'idrocortisone, che ha una azione  
5 inibitoria sulla produzione di MMP1. Le barre rappresentano le deviazioni standard.

La figura 4 mostra la misura della quantità di interleuchina 6 (IL-6) prodotta dai fibroblasti umani HDF in seguito al trattamento con IR (88J/cm<sup>2</sup>) e l'effetto di inibizione sulla sua produzione esercitato  
10 dall'estratto di Pelargonium, usato a 2 diverse concentrazioni. Come controllo positivo è stato usato il TPCK (N-tosil-L- fenilalanina clorometil chetone) una potente molecola con azione antiinfiammatoria. Le barre rappresentano le deviazioni standard.

La figura 5 mostra l'espressione del gene del recettore TRPV1  
15 in fibroblasti umani HDF in seguito al trattamento con IR (88J/cm<sup>2</sup>) e l'effetto di inibizione sulla sua espressione esercitato dall'estratto di Pelargonium, usato a 2 diverse concentrazioni. Come controllo positivo è stato usato il TPCK, una potente molecola con azione antiinfiammatoria. Le barre rappresentano le deviazioni standard.

20 La figura 6 mostra il contenuto di ROS citosolici in chertinociti umani (HaCaT) in seguito al trattamento con luce blu (7 J/cm<sup>2</sup>) e l'effetto di riduzione esercitato dall'estratto di Pelargonium, usato a concentrazione di 0,002%. Come controllo positivo è stato usato l'acido ascorbico, noto per la sua elevata azione antiossidante. Le barre  
25 rappresentano le deviazioni standard.

La figura 7 mostra l'effetto di riduzione della vitalità cellulare in cheratinociti HaCaT esercitato dai raggi UVB (80mJ/cm<sup>2</sup>), ed il recupero prodotto dal trattamento con l'estratto di Pelargonium, usato a concentrazione 0,002%.

5 La figura 8 mostra l'effetto dell'estratto di Pelargonium, usato a 2 diverse concentrazioni, sulla produzione di pro-collagene I e tropoelastina in fibroblasti umani HDF. Le barre rappresentano le deviazioni standard.

#### **Descrizione dettagliata**

10 Secondo una forma di realizzazione della presente invenzione, il procedimento secondo la presente invenzione viene eseguito secondo le seguenti modalità e condizioni:

a) Induzione dei calli da tessuti fogliari: foglie intere vengono prelevate da piante del genere *Pelargonium*, e sterilizzate con etanolo  
15 70% (in acqua v/v), per 15 minuti, e 1% ipoclorito di sodio (in acqua v/v), per altri 15 minuti. Le foglie, dopo essere state lavate per 3 volte in acqua per rimuovere l'alcol e l'ipoclorito, vengono tagliate in porzioni di circa 0,5 cm<sup>2</sup> ciascuno con una lama sterile. Tutti i frammenti di foglia vengono posti su un mezzo solido B5 Gamborg medium contenente:  
20 plant agar 7,5 mg/L, mio-inositolo 500 mg/L, saccarosio 30 g/L, 2,4D 1 mg/L, kinetina 0,01 mg/L, adenina 1 mg/L, pH 5,7. Dopo circa 5 settimane di incubazione a 20°C al buio, si ottengono i calli per proliferazione delle cellule della foglia. I calli vengono escissi e trasferiti su mezzo di coltura fresco ogni 3-4 settimane.

25 b) Prelievo dei calli ed allestimento delle colture liquide:

quando i calli hanno raggiunto un diametro di circa 1 cm (peso di circa 50 mg), essi vengono prelevati e dispersi in beute contenenti 50 ml di mezzo di coltura AB1 liquido (B5 Gamborg medium contenente: mioinositolo 500 mg/L, saccarosio 30 g/L, 2,4D 1 mg/L, kinetina 0,01 mg/L, adenina 1 mg/L, pH 5,7). Le beute vengono poste al buio su uno shaker con agitazione orbitale di 120 rpm. Dopo circa 10 giorni, i calli si sono disgregati, a formare singole cellule o aggregati di cellule più piccoli, e le cellule sono proliferate in modo da formare una coltura densa.

10 c) Crescita delle cellule di *Pelargonium* in coltura liquida: la crescita delle cellule ottenute da espianti di tessuto vegetale può essere condotta inoculando 100 ml di una coltura densa di cellule in 0,5 L di mezzo di coltura AB1 liquido.

15 d) Separazione delle cellule: può essere effettuata mediante centrifugazione a 2000 g, sedimentazione o filtrazione delle cellule per rimuovere il loro mezzo di coltura. Le cellule vengono poi lavate in acqua distillata e congelate a -80°C.

20 e) Omogeneizzazione delle cellule: le cellule congelate vengono rotte meccanicamente (omogeneizzate) in presenza di tampone salino fosfato PBS (NaCl 390 mM, KCl 8 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 36 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,28 mM, pH 7,4) in rapporto di 1:1 volume/peso. In alternativa al PBS, possono essere utilizzati altri tamponi salini (es. carbonati, citrati), soluzioni alcoliche (es. etanolo sciolto in acqua in concentrazioni da 1 a 99%), soluzioni acide o basiche (es. acido acetico o idrossido di sodio a 25 concentrazioni da 0,1 a 0,01%), o soluzioni di glicerina in acqua (1-

90%). L'omogeneizzazione viene effettuata in un frullatore meccanico, precedentemente raffreddato in modo da mantenere una temperatura sotto i 10 °C.

Questa fase può essere effettuata in un contenitore idoneo quale un mortaio di ceramica ed un pestello anch'esso di ceramica, precedentemente raffreddati, o per volumi maggiori si possono utilizzare recipienti più grandi, anche metallici, dove il materiale vegetale può essere omogeneizzato con lame metalliche, utilizzando sia frullatori da laboratorio o industriali, che presse, estrattori ad alta pressione, sonicatori o estrattori con "pulse electric field".

f) Ottenimento dell'estratto idrosolubile: una volta ottenuto un lisato omogeneo tramite omogeneizzazione, il campione viene centrifugato, ad esempio a 8500 rpm per circa 15 minuti a 4°C, per precipitare le componenti insolubili. Il soprannatante ottenuto dalla centrifugazione viene prelevato: esso costituisce l'estratto idrosolubile.

g) Raccolta dell'estratto e liofilizzazione: l'estratto ottenuto nella fase f) viene portato a secco in un liofilizzatore o un roto-evaporatore o una camera di essiccazione o spray-dryer per eliminare il solvente.

La polvere ottenuta viene sciolta in acqua (2 ml ogni grammo di polvere) e la soluzione ulteriormente diluita in un solvente di tipo alcolico, preferibilmente in glicerolo, in modo da ottenere soluzioni idro-alcoliche contenenti da 20 mg a 0,1 mg, preferibilmente da 5 mg a 0,4 mg e ancora più preferibilmente 0,4 mg di estratto ogni ml di solvente (ovvero soluzioni al 12%-0,1%, preferibilmente al 5% - 0,4% e ancora

più preferibilmente allo 0,4%). Queste soluzioni rappresentano la materia prima che può essere ulteriormente diluita per la fabbricazione dei prodotti cosmetici pronti per le applicazioni.

h) Ottenimento dell'estratto liposolubile: metà del residuo insolubile (pellet) ottenuto in seguito a centrifugazione, è risospeso in un solvente lipofilo, (come trigliceridi, oli, alcoli, esteri) in un rapporto 1:10 (peso/volume), ad una temperatura tra i 20 e 70 °C, per un tempo variabile tra 1 a 10 ore. La sospensione viene centrifugata per allontanare il materiale non disciolto e il soprannatante prelevato: esso costituisce il l'estratto lipofilo.

i) Ottenimento dell'estratto di peptidi e zuccheri dalle pareti cellulari: l'altra metà del pellet (contenente le pareti cellulari) ottenuto in fase f) viene prima trattato con EDTA 2 mM a 100 °C, risospeso in 2 volumi di una soluzione di HCl 0,1 N e poi bollito (100°C) per 1 ora, allo scopo di idrolizzare e portare in soluzione tutti gli zuccheri delle glicoproteine delle pareti cellulari.

Dopo la bollitura, il campione viene risospeso, raffreddato (in ghiaccio) e poi digerito enzimaticamente a 37°C per 16 ore con pepsina, utilizzando 1mg di enzima per ml di sospensione. Al termine della digestione enzimatica, condotta per 16-24 ore a circa 37°C, la sospensione viene centrifugata in modo da ottenere una soluzione trasparente: essa costituisce l'estratto idrofilo di peptidi e zuccheri derivati dalle pareti cellulari. Tale estratto viene portato a secco mediante liofilizzazione, come descritta nella fase g).

Gli estratti ottenuti nelle fasi h), i) e f) vengono portati a secco

in un liofilizzatore, rotoevaporatore, camera di essiccazione o spray-dryer per eliminare il solvente. La polvere o la pasta semisolidata ottenuta viene risospesa in acqua (frazione idrosolubile e frazione peptidi/zuccheri) o in solventi organici compatibili con le formulazioni 5 cosmetiche (frazione liposolubile) alla concentrazione desiderata. Nel caso in cui il solvente usato in fase i) sia un olio, come un trigliceride, esso non può essere eliminato, pertanto la soluzione ottenuta costituisce già l'ingrediente attivo da utilizzare in formulazioni per applicazioni cosmetiche e dermatologiche.

10 Le soluzioni ottenute, contenenti le diverse frazioni (idrosolubile, liposolubile e quella di peptidi/zuccheri) possono essere ulteriormente disciolte in un appropriato volume di glicerolo o di altro solvente (oli, alcoli, steroli), a seconda del tipo di frazione prodotta, in modo da avere una concentrazione di frazione purificata variabile dallo 15 0,1 % al 20% (w/v), preferibilmente 0,4%-5%, ancor più preferibilmente 0,4%. Queste soluzioni rappresentano la materia prima che viene aggiunta ai formulati per la fabbricazione dei prodotti cosmetici o dermatologici pronti per le applicazioni.

20 Particolarmente preferite sono le soluzioni idroalcoliche dove il solvente è glicerolo.

In conclusione, costituisce oggetto della presente invenzione: l'estratto idrosolubile delle cellule vegetali in coltura, preferibilmente del genere *Pelargonium capitatum* ottenibile mediante il metodo a) – f), l'estratto liposolubile ottenibile mediante il metodo a) – h) e l'estratto di 25 peptidi e zuccheri dalle pareti cellulari ottenibile mediante il metodo a) –

i). Inoltre, l'invenzione si riferisce anche al metodo di allestimento delle suddette colture cellulari mediante induzione con specifici trattamenti e condizioni di crescita messi a punto dalla Richiedente, che permettono di ottenere gli estratti descritti ricchi di sostanze ad azione benefica su  
5 cellule della pelle.

Formano altresì oggetto dell'invenzione composizioni cosmetiche comprendenti l'estratto idrosolubile, l'estratto liposolubile e l'estratto di peptidi/zuccheri dalle pareti cellulari, singolarmente o in  
combinazione.

10 Nella forma di realizzazione in cui la composizione cosmetica comprende un singolo estratto, detto estratto o le sue soluzioni sono contenuti nelle composizioni cosmetiche dell'invenzione in concentrazioni variabili da 0,0001% a 10%, preferibilmente da 0,001% a 8% e ancora più preferibilmente alla concentrazione dello 0,5%, dove  
15 dette percentuali sono espresse in peso rispetto al peso totale della composizione.

Nella forma di realizzazione in cui la composizione cosmetica comprende tutti e tre gli estratti, esse contengono, vantaggiosamente, per una parte in peso dell'estratto idrosolubile, da 0,01 a 100,  
20 preferibilmente 1, parti in peso di estratto liposolubile e da 0,01 a 100, preferibilmente 1, parti in peso di estratto ricco in peptidi e zuccheri, eventualmente insieme ad un solvente idrofilo scelto tra acqua, soluzioni acquose, solventi organici, preferibilmente oli, alcoli, glicerolo acidi organici, ammidi, ammine, aldeidi o chetoni.

25 Anche in tale forma di realizzazione la composizione cosmetica

comprende ciascuno dei tre estratti ad una concentrazione variabile da 0,0001% a 10%, preferibilmente da 0,001% a 8% e ancora più preferibilmente alla concentrazione dello 0,5%, dove dette percentuali sono espresse in peso rispetto al peso totale della composizione.

5 Una composizione cosmetica particolarmente preferita comprende, per una parte in peso dell'estratto idrosolubile, una parte in peso di estratto liposolubile e 0,1 parti in peso di estratto ricco in peptidi e zuccheri eventualmente insieme ad almeno uno dei suddetti solventi organici.

10 La presente invenzione riguarda inoltre l'uso cosmetico di tali composizioni per il trattamento e la prevenzione del foto-invecchiamento della pelle dovuto ad esposizione a luce blu, luce ultravioletta o radiazione infrarossa.

Infine, la presente invenzione riguarda altresì una  
15 formulazione comprendente una composizione come sopra definita e un veicolo, eccipiente e/o adiuvante cosmeticamente accettabili.

I veicoli che possono essere impiegati sono lipidi, ovvero esteri glicerici (o trigliceridi) in forma di oli e burri (come ad esempio trigliceride caprico/caprilico o burro di carità), esteri non glicerici, quali  
20 esteri tra acidi grassi e alcol grassi, i sali degli acidi grassi quali gli stearati, glicoli (esempio glicole polietilenico, propilenico o butilenico), alcoli grassi (alcol cetilico), liposomi multilamellari, polisaccaridi (fibre di acacia, ciclodestrine o gomma xantana) oppure silicati. Possono essere utilizzati anche idrocarburi paraffinici, quali ad esempio olio  
25 minerale (paraffina liquida), vaselina filante o petrolato, paraffine solide

come la cera microcristallina, la ceresina o l'ozocherite, e/o idrocarburi terpenici, quali ad esempio squalene, squalano o pristano.

Tali formulazioni possono essere sotto forma di creme, gel, lozioni cosmetiche per l'applicazione cutanea, emulsioni A/O e O/A, 5 latti, nonché rossetti, fondotinta e trucchi.

A titolo esemplificativo, ma non limitativo della presente invenzione, si riportano di seguito alcuni esempi relativi alla preparazione delle colture vegetali della specie *Pelargonium capitatum* ed esperimenti che dimostrano l'attività biologica di detti estratti in campo 10 cosmetico.

### **ESEMPI**

#### **ESEMPIO 1: Allestimento dei calli da piante di**

#### **Pelargonium**

A partire da pezzi di foglia di piantine giovani appartenenti alle 15 specie *Pelargonium capitatum* sono state allestite colture di calli vegetali su mezzo solido. Le foglie sono state recise, private della nervatura centrale e tagliate in modo da ottenere pezzi di dimensioni 5 mm x 5 mm. Questi sono stati posti su substrato solido B5M (Gamborg B5 medium including vitamins 3,1g/l, myo-inositolo 500 mg/L, 20 saccarosio 30g/l, microagar 7g/l, pH 5.7) addizionato con acido 2,4 Diclorofenossiacetico 1mg/l, adenina 1g/l kinetina 0,1mg/l a 27°C al buio per circa 30 giorni quando sono comparsi i primi calli.

**ESEMPIO 2: Preparazione dell'estratto idrosolubile e 25 valutazione della sua capacità di proteggere e riparare dai danni causati da raggi infrarossi**

### Materiali e metodi

Estrazione della miscela idrosolubile dalle cellule di *Pelargonium*.

100 g di cellule di *Pelargonium capitatum* in coltura liquida  
5 sono state sedimentate per centrifugazione e lavate in acqua distillata.

Il sopranatante è stato eliminato per aspirazione ed il pellet di cellule è stato congelato a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al suo utilizzo. Le cellule, una volta scongelate, sono state omogeneizzate in un mortaio con 200 ml di tampone PBS. L'omogeneizzato è stato centrifugato a 8.500 rpm per 15  
10 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$  e il sopranatante, che costituisce l'estratto idrosolubile, è stato prelevato e conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'estratto è stato successivamente liofilizzato per circa 3 giorni in modo da ottenere una polvere fine. La polvere ottenuta (2 g) è stata sciolta in acqua distillata sterile alla concentrazione del 10%, e poi ulteriormente diluita alla concentrazione  
15 richiesta da ogni tipo di saggio biologico.

L'estratto è stato pre-testato su fibroblasti umani per stabilirne le dosi di utilizzo e per escludere un'eventuale citotossicità.

### Saggio di citotossicità

Questo saggio si basa sull'uso del MTT [3-(4,5-dimetiltiazolil)-  
20 2,5-difeniltetrazoliobromuro] descritto da Mosmann nel 1983 per la prima volta. È basato sulla capacità dell'enzima deidrogenasi mitocondriale delle cellule vitali di idrolizzare l'anello tetrazolico del MTT (di colore giallo chiaro) e formare cristalli di formazano (di colore blu scuro). Tali cristalli sono impermeabili alle membrane cellulari e si  
25 accumulano nel citoplasma delle cellule metabolicamente attive. Il

numero di cellule vive e sane è così direttamente proporzionale al livello di formazano prodotto.

1,5 x 10<sup>4</sup> di cellule di fibroblasti umani adulti (HDF) per pozzetto sono state cresciute in piastre da 96 pozzetti in mezzo di coltura DMEM (Gibco), supplementato con il 10% di siero fetale bovino ("Fetal Bovine Serum" FBS), per circa 20 ore. Dopo il trattamento con 0,002% dell'estratto di *Pelargonium* per 48 ore, le cellule sono state lavate in PBS ed incubate con 100 µl/pozzetto di "tampone di reazione" contenente: 10 mM di HEPES, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM di glucosio e 0,5 mg/ml di substrato colorimetrico MTT in tampone PBS a pH 7,4. Dopo 3 ore di incubazione a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di soluzione solubilizzante contenente 10% di Triton-X100, 0,1 N di HCl in isopropanolo assoluto. Dopo 30 minuti, la reazione colorimetrica è stata misurata a 595 nm con il lettore di piastre Victor3.

#### Saggio di misurazione dei ROS mitocondriali

8 x 10<sup>3</sup> di cellule HDF per pozzetto sono state cresciute in piastre da 96 pozzetti in mezzo DMEM (Gibco) supplementato con il 10% di FBS per 20 ore. Il giorno dopo le cellule sono state trattate per 24 ore con diverse concentrazioni (0,002% e 0,006%) dell'estratto di *Pelargonium* e con il coenzima Q10 20 µM come controllo positivo (il controllo negativo era rappresentato da cellule HDF non trattate). Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate in PBS e incubate con il colorante Mito Sox (Molecular Probes) a 37°C per 10 minuti. Successivamente le cellule sono state irradiate in PBS con raggi

infrarossi per 15' in modo da avere un'energia pari a 44J/cm<sup>2</sup>. Al termine dell'irradiazione, le cellule sono state incubate per 30 minuti e poi la fluorescenza è stata letta a 510/580 nm, utilizzando il Victor3 (Perkin Elmer).

5                    Saggio di misurazione dell'ATP

8 x 10<sup>3</sup> di cellule HDF per pozzetto sono state cresciute in piastre da 96 pozzetti in mezzo di colture DMEM (Gibco), supplementato con 10% di FBS per 20 ore. Il giorno dopo le cellule sono state trattate per 6 ore con diverse concentrazioni (0,002% e 0,006%) dell'estratto di  
10 *Pelargonium* e con il Resveratrolo 100 µM come controllo positivo (il controllo negativo era rappresentato da cellule HDF non trattate).

Le cellule sono state poi irradiate per 14' in modo da avere un'energia pari a 44J/cm<sup>2</sup>.

Dopo 24 ore, le cellule sono state lavate con PBS ed incubate  
15 per 30 minuti in 50 µl di mezzo di coltura a temperatura ambiente. Un eguale volume di CellTiter-Glo (Promega) è stato successivamente aggiunto ai campioni, e miscelato per due minuti per indurre la lisi delle cellule: il CellTiter-Glo è una miscela contenente l'enzima luciferasi che, degradando il suo substrato (la luciferina, anch'essa presente nella  
20 miscela di reazione) genera un segnale luminoso. La reazione è dipendente dalla quantità di ATP presente. Il segnale luminoso emesso dai campioni è stato misurato a 595 nm dopo 15 minuti, usando un lettore di piastre Victor 3 (PerkinElmer). Come standard di riferimento, sono state usate diluzioni scalari di ATP, da 5000 a 5 pMoli.

25                    Analisi della sintesi della proteina IL6

1 x 10<sup>4</sup> di cellule HDF per pozzetto sono state cresciute in piastre da 96 pozzetti in mezzo di coltura DMEM con FBS 10%.

Dopo 20 ore, il mezzo è stato sostituito con mezzo DMEM senza FBS, e il giorno successivo sono state aggiunte diverse  
5 concentrazioni (0,002% e 0,006%) dell'estratto di *Pelargonium* e il TPCK 1 µM come controllo positivo (il controllo negativo era rappresentato da cellule HDF non trattate).

Dopo ulteriori 24 ore, le cellule sono state lavate con PBS e poi irradiate con raggi infrarossi per 30' in modo da avere un'energia pari a  
10 88 J/cm<sup>2</sup>. Dopo l'irradiazione, è stato aggiunto di nuovo il mezzo con i trattamenti (ossia, l'estratto di *Pelargonium* e il TPCK alle suddette concentrazioni) e le cellule sono state incubate per altre 24 ore.

Al termine dell'incubazione, sono stati prelevati i surnatanti e trasferiti in un'altra piastra per la determinazione del contenuto di  
15 interleuchina 6 (IL6).

Dopo incubazione per 1 notte a 4°C, è stato eliminato il mezzo e sono stati effettuati tre lavaggi con "Wash buffer" (PBS 1x, Tween 20 0,025%).

È stato effettuato un "blocking" per 30' con siero albumina  
20 bovina (BSA) al 3% e poi è stata aggiunta la soluzione di anticorpo primario (Ab6672 Abcam) 1:1000 in "wash buffer" contenente BSA 1%. L'incubazione è avvenuta per 2 ore a temperatura ambiente, dopo 3 lavaggi è avvenuta l'incubazione con l'anticorpo secondario (Goat anti-rabbit Biorad IgG-HRP) diluito 1:1000 in "wash buffer" contenente BSA  
25 1%. Dopo 3 lavaggi, la reazione è stata sviluppata aggiungendo 100 µl di

Buffer citrato 50 mM, OPD (O- fenilendiammina) 0,35mg/ml, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,012%. Dopo lo sviluppo del colore, è stata letta l'assorbanza a 490nm.

#### Analisi dell'espressione del gene TRPV1

1,2 x 10<sup>5</sup> di cellule HDF per pozzetto sono state cresciute in  
5 piastre da 6 pozzetti in mezzo di coltura DMEM (Gibco), supplementato con 10% di Siero Bovino Fetale (FBS) per 20 ore. Il giorno dopo il mezzo è stato sostituito con mezzo DMEM privo di FBS e le cellule sono state incubate per altre 24 ore.

Il terzo giorno sono stati aggiunti i trattamenti con le diverse  
10 concentrazioni (0,002% e 0,006%) dell'estratto di *Pelargonium* e il TPCK 10µM come controllo positivo (il controllo negativo era rappresentato da cellule HDF non trattate). Il giorno successivo, le cellule sono irradiate con raggi infrarossi in PBS per 30' in modo da avere un'energia pari a 88 J/cm<sup>2</sup>. Al termine dell'irradiazione, è stato aggiunto di nuovo il  
15 mezzo con i trattamenti (ossia, l'estratto di *Pelargonium* e il TPCK alle suddette concentrazioni) e le cellule sono state incubate per altre 24 ore.

Per l'estrazione dell'RNA dai campioni di cellule è stato  
utilizzato il kit "GenElute™ Total RNA Purification" acquistato dalla  
20 ditta Sigma. Dopo i trattamenti indicati, le cellule sono state lavate con PBS, staccate in buffer di lisi e sottoposte alla procedura di estrazione come da protocollo del kit. I campioni di RNA sono stati sottoposti ad un trattamento con DNasi I (Ambion) per eliminare il DNA genomico contaminante, a 37°C per 30 minuti, a pH 7,5. 2 µl di ciascun campione  
25 sono stati caricati su gel di agarosio 1% in presenza di "loading dye"

denaturante e quantificati utilizzando come riferimento uno specifico marker per RNA (Thermo Scientific). Per la quantificazione è stato usato il software Gene tools (Perkin Elmer).

300 ng di RNA totale è stato retro-trascritto usando l'enzima  
5 Trascrittasi Inversa (Thermo Scientific). Le reazioni di RT-PCR  
semiquantitativa sono state condotte utilizzando come standard interni  
la coppia di primer universali 18S primer/competimer (Ambion) in  
rapporto 5:5. I prodotti di PCR sono stati separati su gel d'agarosio  
1,5%, visualizzati utilizzando lo strumento Geliance (Perkin Elmer) ed  
10 analizzati per via densitometrica utilizzando il software Genetools. I  
valori riportati nei grafici rappresentano il rapporto tra l'intensità della  
banda relativa al gene in analisi e quella della banda relativa allo  
standard di riferimento 18S, in modo da avere un valore correlato alla  
reale espressione di quel gene e non dipendente dalla quantità di RNA o  
15 di reagenti di PCR presenti in quel campione. I valori sono stati poi  
convertiti in percentuale (%), fissando il valore ottenuto dal controllo  
non trattato come 100%. Le sequenze dei primers usati per  
l'amplificazione sono:

Hs TRPV1 for: SEQ ID NO: 1

20 Hs TRPV1 rev: SEQ ID NO: 2.

#### Analisi della sintesi della proteina MMP1

1,8 x 10<sup>4</sup> di cellule HDF per pozzetto sono state cresciute in  
piastre da 96 pozzetti in mezzo di coltura DMEM con FBS 10%. Dopo 6  
ore, il mezzo è stato sostituito con mezzo DMEM senza FBS, contenente  
25 diverse concentrazioni (0,002% e 0,006%) dell'estratto di *Pelargonium* e

l'idrocortisone 0,25% come controllo positivo (il controllo negativo era rappresentato da cellule HDF non trattate).

Il giorno successivo le cellule sono state lavate con PBS e poi irradiate con raggi Infrarossi per 30' in modo da avere un'energia pari a 5 88J/cm<sup>2</sup>. Dopo l'irradiazione è stato aggiunto di nuovo il mezzo con i trattamenti (ossia, l'estratto di *Pelargonium* e l'idrocortisone alle suddette concentrazioni) e le cellule sono state incubate per altre 72 ore. Al termine dell'incubazione, sono stati prelevati i surnatanti e trasferiti in un'altra piastra per la determinazione del contenuto di 10 MMP1 mediante saggio ELISA. Il saggio prevede un'incubazione per 1 notte a 4°C dei surnatanti, eliminazione del mezzo di coltura e lavaggio dei pozzetti per tre volte con "Wash buffer" (PBS 1x, Tween 20 0,025%). Dopo un "blocking" per 30' con BSA 3% e una soluzione contenente l'anticorpo primario (MMP1 polyclonal antibody Thermo Fisher) è stato 15 aggiunto in diluizione 1:1000 in "wash buffer", contenente BSA 1%. Dopo un incubazione di 2 ore a temperatura ambiente e 3 lavaggi con il suddetto "wash buffer", i pozzetti sono stati incubati con l'anticorpo secondario (Goat anti-rabbit Biorad IgG-HRP) diluito 1:1000 in "wash buffer" contenente BSA 1%. Dopo 3 lavaggi con il suddetto "wash 20 buffer", sono stati aggiunti 100 µl di buffer citrato 50 mM, OPD 0,35mg/ml, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,012%, e la reazione colorimetrica misurata come valore di assorbanza a 490nm.

#### Saggio di misurazione dei ROS citosolici

1,8 x 10<sup>4</sup> di Ccellule HaCaT per pozzetto sono state cresciute 25 in piastre da 96 pozzetti in mezzo DMEM (Gibco) supplementato con

FBS 10% per 20 ore. Il giorno dopo, le cellule sono state trattate per 2 ore con 0,002% dell'estratto di *Pelargonium* e con l'acido ascorbico 500 µM come controllo positivo (il controllo negativo era rappresentato da cellule HaCaT non trattate). Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate in PBS e incubate con il colorante CM-DCFDA (Molecular Probes) a 37°C per 45 minuti. Successivamente, le cellule sono state irradiate con raggi di luce blu per 8' in modo da avere un'energia pari a 7J/cm<sup>2</sup>. Al termine dell'irradiazione, le cellule sono state incubate per 30 minuti ed è stata misurata la fluorescenza a 485/535 nm mediante lo strumento Victor3 (Perkin Elmer).

#### Analisi della vitalità cellulare mediante MTT

1,2 10<sup>4</sup> di cellule HaCaT per pozzetto sono state cresciute in piastre da 96 pozzetti in mezzo DMEM supplementato con FBS 10% per 20 ore. Il giorno dopo le cellule sono state trattate per 2 ore con 0,002% dell'estratto di *Pelargonium* (il controllo negativo era rappresentato da cellule HaCaT non trattate).

Dopo essere state lavate con PBS, le cellule sono state irradiate con raggi UVB in modo da avere un'energia pari a 80 mJ/cm<sup>2</sup>. Al termine dell'irradiazione è stato aggiunto di nuovo il mezzo con i trattamenti (ossia, l'estratto di *Pelargonium* alla suddetta concentrazione) e dopo 24 ore il saggio MTT è stato sviluppato come descritto precedentemente.

#### Analisi del contenuto delle proteine ProCollagene I e Tropoelastina

8 x 10<sup>4</sup> di cellule HDF per pozzetto sono state cresciute in

piastre da 96 pozzetti in mezzo di coltura DMEM con FBS 10%. Dopo 20 ore, le cellule sono state trattate in DMEM con 2% di FBS con diverse concentrazioni (0,002% e 0,006%) dell'estratto di *Pelargonium* o con il TGF- $\beta$ , a concentrazione di 2,5 ng/ml, usato come controllo positivo (il controllo negativo era rappresentato da cellule HDF non trattate). Il giorno successivo, i surnatanti sono stati trasferiti su un'altra piastra e sottoposti alla successiva analisi del contenuto di tropoelastina mediante saggio ELISA, mentre le cellule sono state lavate in PBS e sottoposte all'analisi del contenuto di ProCollagene I con saggio ELISA. La procedura del saggio ELISA è quella descritta precedentemente ma in questo caso gli anticorpi usati sono stati: per il ProCollagene I, il ProCollA2 (sc-166572 Santa Cruz) con antigoat IgG-HRP (sc-2961 Sanata Cruz), mentre per la Tropoelastina, il AB 21600 (Abcam), seguito da un secondario anti-rabbit (Biorad 1706515).

## 15 **RISULTATI**

### Studio della capacità dell'estratto di *Pelargonium* di proteggere dai danni dei raggi IR

Uno degli effetti delle radiazioni IR è la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei mitocondri, che causano stress ossidativo danneggiando la cellula e la sua funzionalità.

Allo scopo quindi di valutare il potere protettivo dell'estratto di *Pelargonium* contro i raggi IR, sono stati condotti dei test di misurazione dei ROS mitocondriali e contenuto di ATP in fibroblasti umani HDF.

Come si evince dalla figura 1, la produzione dei ROS mitocondriali indotta da raggi IR è stata significativamente inibita in

fibroblasti umani dal trattamento con l'estratto di *Pelargonium*, usato a due diverse concentrazioni. Il trattamento con l'estratto ha portato ad una riduzione dei ROS di circa 12-15 %, similmente al controllo positivo Coenzima Q. Dato che l'aumento dei ROS mitocondriali porta ad una alterazione della funzionalità dei mitocondri, e pertanto ad una riduzione della produzione di ATP, abbiamo misurato l'effetto dell'estratto di *Pelargonium* anche sulla sintesi di nuovo ATP.

In figura 2 viene mostrata la quantificazione delle molecole di ATP in fibroblasti umani trattati con l'estratto, in seguito a stress causato da raggi IR. Come si può osservare, le cellule producono una minore quantità di ATP in seguito al trattamento con IR, ma i trattamenti con l'estratto di *Pelargonium*, analogamente al resveratrolo usato come controllo positivo, ripristinano la produzione di ATP: un aumento variabile tra il 20 e 34 %, rispetto al campione di cellule stressate con IR ma non trattato con i composti.

È inoltre noto che il trattamento delle cellule della pelle con raggi IR porta ad un incremento della produzione di metallo-proteinasi, come MMP1, determinando un aumento della degradazione del collagene, principale componente di sostegno della matrice extracellulare della pelle.

Come mostrato in figura 3, il trattamento con l'estratto di *Pelargonium* porta ad una attenuazione nella sintesi di MMP1, indotta invece dal trattamento con raggi IR. Una riduzione simile è stata osservata nel campione trattato con l'idrocortisone, noto agente protettore. Un ulteriore effetto causato dai raggi IR è la iperproduzione

di interleuchine infiammatorie, come IL-6, mediata dal recettore TRPV1. In figura 4 è mostrato come l'estratto di *Pelargonium*, alle due diverse concentrazioni, inibisce il rilascio di IL-6 da parte dei fibroblasti, con una riduzione che va dal 14 al 25 %. In questo caso, come controllo  
5 positivo è stato usato il TPCK, una molecola nota per la sua azione antinfiammatoria.

Inoltre, come mostrato in figura 5, l'estratto di *Pelargonium* produce anche un effetto significativo di riduzione sull'espressione del gene di TRPV1, una riduzione che va dal 28 al 42 %. Tutti questi  
10 risultati confermano che l'estratto idrosolubile di *Pelargonium* è capace di contrastare gli effetti negativi prodotti dalle radiazioni IR sulle cellule della pelle.

#### Studio della capacità dell'estratto di Pelargonium di proteggere dai danni della luce blu

15 Uno dei principali effetti dannosi prodotti dalla luce blu sulla pelle è quello di aumentare la produzione di ROS citosolici, portando ad un danno ossidativo sui componenti cellulari.

Per valutare la capacità dell'estratto di proteggere dall'aumento dei ROS causati dalla luce blu, cheratinociti umani sono  
20 stati trattati con l'estratto di *Pelargonium* e poi irraggiati con luce blu.

In figura 6 è mostrato l'effetto di protezione dall'aumento dei ROS indotti da luce blu sui cheratinociti: l'estratto di *Pelargonium*, a concentrazione di 0,002%, ha completamente abolito l'aumento dei ROS indotti dalla luce blu, analogamente all'acido ascorbico, usato come  
25 controllo positivo del saggio. Per verificare se l'estratto avesse un effetto

protettivo contro i danni causati da raggi UV, è stata misurata la vitalità dei cheratinociti dopo trattamento con raggi UVB, in presenza ed in assenza dell'estratto di *Pelargonium* alla concentrazione di 0,002%.

5 Come mostrato in figura 7, l'estratto ha significativamente protetto le cellule dai raggi UV, determinando una attenuazione della mortalità cellulare di circa 40%. Questi risultati indicano che l'estratto idrosolubile di *Pelargonium* è capace di contrastare gli effetti negativi prodotti sia dalla luce blu che dai raggi UVB sulle cellule della pelle.

10 Studio dell'effetto dell'estratto di *Pelargonium* sulla produzione delle proteine della matrice

Allo scopo di dimostrare se l'estratto di *Pelargonium* avesse un effetto di induzione della produzione delle proteine della matrice extracellulare, e quindi potesse essere utilizzato come un potenziale ingrediente attivo in applicazioni cosmetiche anti-invecchiamento, 15 fibroblasti umani sono stati trattati con due diverse concentrazioni dell'estratto, oppure con il TGF- $\beta$  usato come controllo positivo, e la produzione di pro-collagene I (forma di collagene immaturo neo-sintetizzato) e di tropo-elastina sono stati misurati mediante saggio ELISA. Come mostrato in figura 8, l'estratto di *Pelargonium*, ad 20 entrambe le concentrazioni, ha prodotto un significativo effetto di induzione delle proteine della matrice, collagene ed elastina, suggerendo un suo potenziale utilizzo come ingrediente attivo in formulazioni ad uso cosmetico.

25 **ESEMPIO 3: Preparazione dell'estratto liposolubile da colture cellulari della specie *Pelargonium capitatum***

Il residuo insolubile (pellet) ottenuto dopo l'estrazione delle componenti idrofile dalle cellule di *Pelargonium capitatum*, è stato trattato con il solvente trigliceride caprilico/caprico in un rapporto 1:10 (peso/volume) (in alternativa possono essere utilizzati solventi organici come alcoli, acetone, etere o altri solventi apolari) e lasciato in agitazione per 4 ore ad una temperatura di 60 °C per portare in soluzione le componenti liposolubili. Dopo centrifugazione a 6000 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente, la fase liquida è stata prelevata: essa costituisce l'estratto liposolubile concentrato da poter usare in formulazioni cosmetiche in percentuali variabili tra lo 0,0001 e 10%.

**ESEMPIO 4: Preparazione dell'estratto di zuccheri e peptidi da colture cellulari della specie *Pelargonium capitatum***

Il residuo insolubile (pellet), ottenuto dopo l'estrazione delle componenti idrofile dalle cellule di *Pelargonium capitatum*, è stato trattato per 1 ora con EDTA 2 mM a 100°C in rapporto 1:3 (peso/volume). Dopo il raffreddamento, la soluzione è stata filtrata, mentre il pellet è stato prima lavato con acqua distillata e poi trattato per un'ora con HCl 0,1 N (pH 1,0) a 100°C in rapporto 1:3 (peso/volume) per idrolizzare gli zuccheri delle pareti cellulari. La sospensione così ottenuta è stata trattata con pepsina O/N a 37°C per staccare e digerire le proteine dalle pareti cellulari. Il soprannatante contenente la frazione glucidica e peptidica è stato recuperato in seguito a centrifugazione, il pH portato a 6,5 con aggiunta di NaOH 10 N e poi portato a secco in un liofilizzatore. Il residuo solido è stato risospeso in glicerolo, esso costituisce la preparazione di peptidi e zuccheri da

utilizzare in formulazioni cosmetiche in percentuali variabili tra lo 0.0001 e 10%.

### **BIBLIOGRAFIA**

- 5 Barolet D, Christiaens F, Hamblin MR (2016). Infrared and skin: Friend or foe. *J Photochem Photobiol B.*, 155:78-85.
- Hamidpour R, Hamidpour S, Hamidpour M, Marshall V and Hamidpour R (2017). *Pelargonium graveolens* (Rose Geranium)– A Novel Therapeutic Agent for Antibacterial, Antioxidant, Antifungal and Diabetics. *Arch in Cancer Research*, vol.5 (1): 134.
- 10 Hsu WL, Yoshioka T. (2015). Role of TRP channels in the induction of heat shock proteins (Hsps) by heating skin. *Biophysics (Nagoya-shi)*, 13; 11:25-32.
- Kozłowska J, Kaczmarski A, Stachowiak N and Sionkowska A (2017). Evaluation of Sebostatic Activity of *Juniperus communis* Fruit Oil and *Pelargonium graveolens* Oil Compared to Niacinamide. *Cosmetics*, 4: 36.
- 15 Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*; 65(1-2):55-63.
- 20 Nakashima Y, Ohta S, Wolf AM (2017). Blue light-induced oxidative stress in live skin. *Free Radic Biol Med.*, 108:300-310.
- Natarajan VT, Ganju P, Ramkumar A, Grover R, Gokhale RS (2014). Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nat Chem Biol.*, 10(7): 542-51.
- 25 Petlevski R, Flajs D, Kalodera Z, Zovko Končića M (2013).

Composition and antioxidant activity of aqueous and ethanolic Pelargonium radula extracts. South African Journal of Botany, Volume 85, Pages 17-22.

Schroeder P, Schieke SM, Morita A (2006) Premature Skin Aging by Infrared Radiation, Tobacco Smoke and Ozone. In: Gilchrest B.A., Krutmann J. (eds) Skin Aging. Springer, Berlin, Heidelberg.

WO2007104489. Method for the preparation of a composition based on 4-hydroxyproline and the uses thereof in the agronomical field. G. Colucci, F. Apone, M.J. Chrispeels.

10

  
Dr.ssa Elisa Calzi  
N. Iscr. ALBO 1789 B

**RIVENDICAZIONI**

1. Uso cosmetico di almeno un estratto derivato da colture di cellule vegetali appartenenti alla specie *Pelargonium capitatum* per il trattamento e/o la prevenzione del foto-invecchiamento della pelle  
5 dovuto a esposizione a luce ultravioletta, luce blu o radiazione infrarossa.
2. Procedimento per la preparazione di almeno un estratto da colture di cellule vegetali appartenenti alla specie *Pelargonium capitatum*, comprendente le fasi di:
- 10 a) coltivare dette cellule di *Pelargonium capitatum* in un mezzo di coltura liquido;
- b) omogeneizzare le cellule in una soluzione acquosa salina, ottenendo un omogenato;
- c) separare la parte solida di detto omogenato dalla parte  
15 liquida, che costituisce un estratto idrosolubile.
3. Procedimento secondo la rivendicazione 2, in cui dette colture di cellule vegetali sono ottenute prelevando tessuto vegetale da piante, inducendo la formazione di calli da detto tessuto su un substrato solido, prelevando detti calli e allestendo colture liquide da  
20 essi.
4. Procedimento secondo la rivendicazione 2 o 3, in cui detta fase c) di separare la parte solida dell'omogenato dalla parte liquida è eseguita mediante centrifugazione, sedimentazione o filtrazione.
5. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni  
25 da 2 a 4, che comprende ulteriormente una fase di trattare detta parte

solida con un solvente lipofilo, ottenendo un estratto liposolubile.

6. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni da 2 a 4, comprendente una fase ulteriore di trattare detta parte solida con acidi ed enzimi proteolitici in soluzione acquosa, ottenendo un  
5 estratto comprendente peptidi e zuccheri.

7. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui detto almeno un estratto è un estratto idrosolubile ottenuto mediante il procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 2-4.

8. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui detto almeno un  
10 estratto è un estratto liposolubile ottenuto mediante il procedimento secondo la rivendicazione 5.

9. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui detto almeno un estratto è un estratto ricco in peptidi e zuccheri ottenuto mediante il procedimento secondo la rivendicazione 6.

15 10. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui detto almeno un estratto comprende almeno due dei tre estratti definiti nelle rivendicazioni 7-9 e preferibilmente tutti e tre.

11. Composizione comprendente un estratto idrosolubile ottenuto mediante il procedimento secondo una qualunque delle  
20 rivendicazioni 2-4 e/o un estratto liposolubile ottenuto mediante il procedimento secondo la rivendicazione 5 e/o un estratto ricco in peptidi e zuccheri ottenuto mediante il procedimento secondo la rivendicazione 6.

12. Composizione secondo la rivendicazione 11, contenente,  
25 per una parte in peso di detto estratto idrosolubile, da 0,01 a 100,

preferibilmente 1, parti in peso di detto estratto liposolubile e, indipendentemente, da 0,01 a 100, preferibilmente 1, parti in peso di detto estratto ricco in peptidi e zuccheri.

13. Composizione secondo una qualunque delle rivendicazioni 5 11 e 12, comprendente almeno un solvente idrofilo scelto dal gruppo comprendente acqua, soluzioni acquose saline, e solventi organici, preferibilmente oli, alcoli, glicerolo, acidi organici, ammidi, ammine, aldeidi e chetoni.

14. Composizione secondo la rivendicazione 13, in cui detto 10 solvente idrofilo è una soluzione idroalcolica, preferibilmente una miscela acqua/glicerina, e detto estratto idrosolubile è contenuto in una concentrazione di 0,0001-10%, preferibilmente alla concentrazione di 0,4 % in peso sul peso della composizione.

15. Uso cosmetico di una composizione secondo una 15 qualunque delle rivendicazioni 11-14 per il trattamento del foto-invecchiamento della pelle dovuto ad esposizione a luce ultravioletta, luce blu o raggi infrarossi.

16. Formulazione cosmetica comprendente un estratto come 20 definito in una qualunque delle rivendicazioni 1, 7-9 o una composizione secondo una qualunque delle rivendicazioni 11-14 e un veicolo cosmeticamente accettabile.

  
Dr.ssa Elisa Calzi  
N. Iscr. ALBO 1789 B

FIGURA 1.

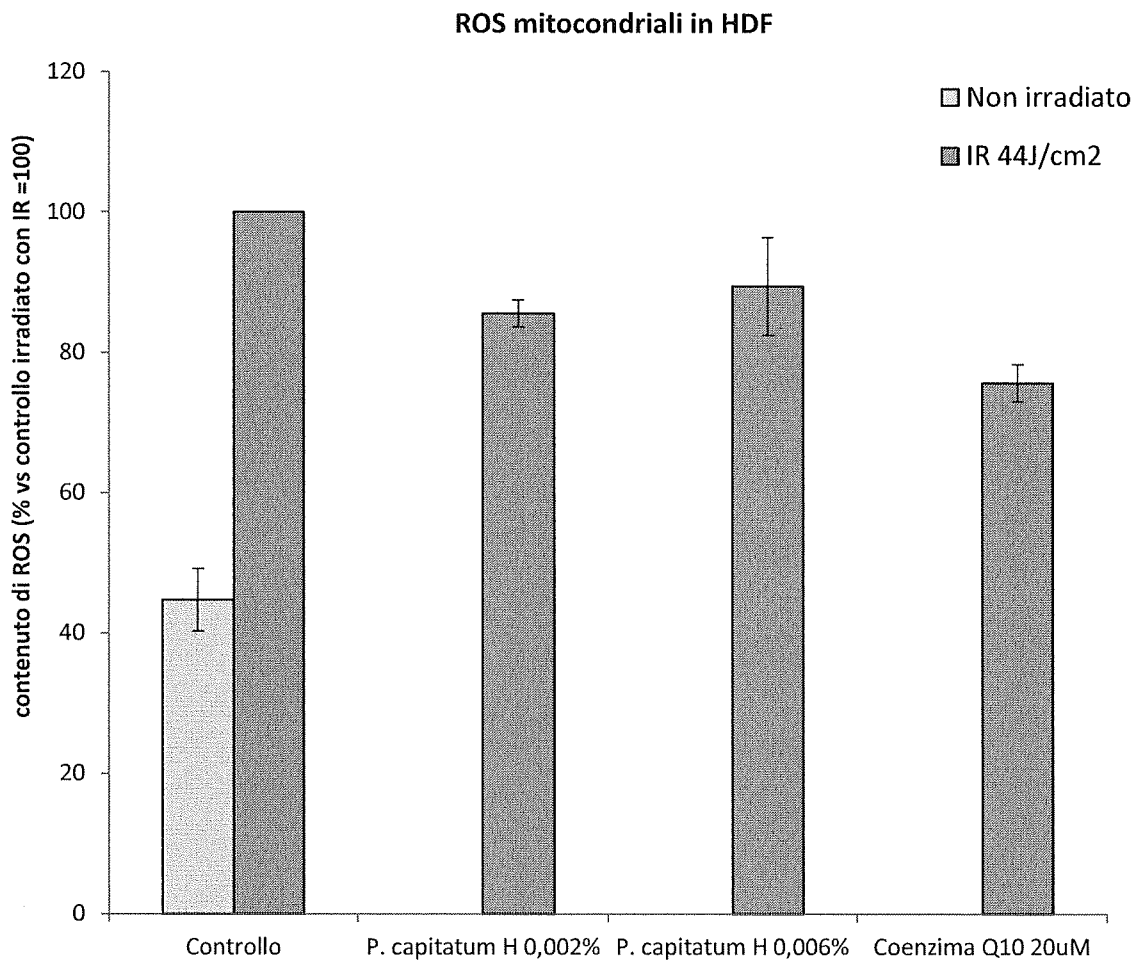


FIGURA 2.

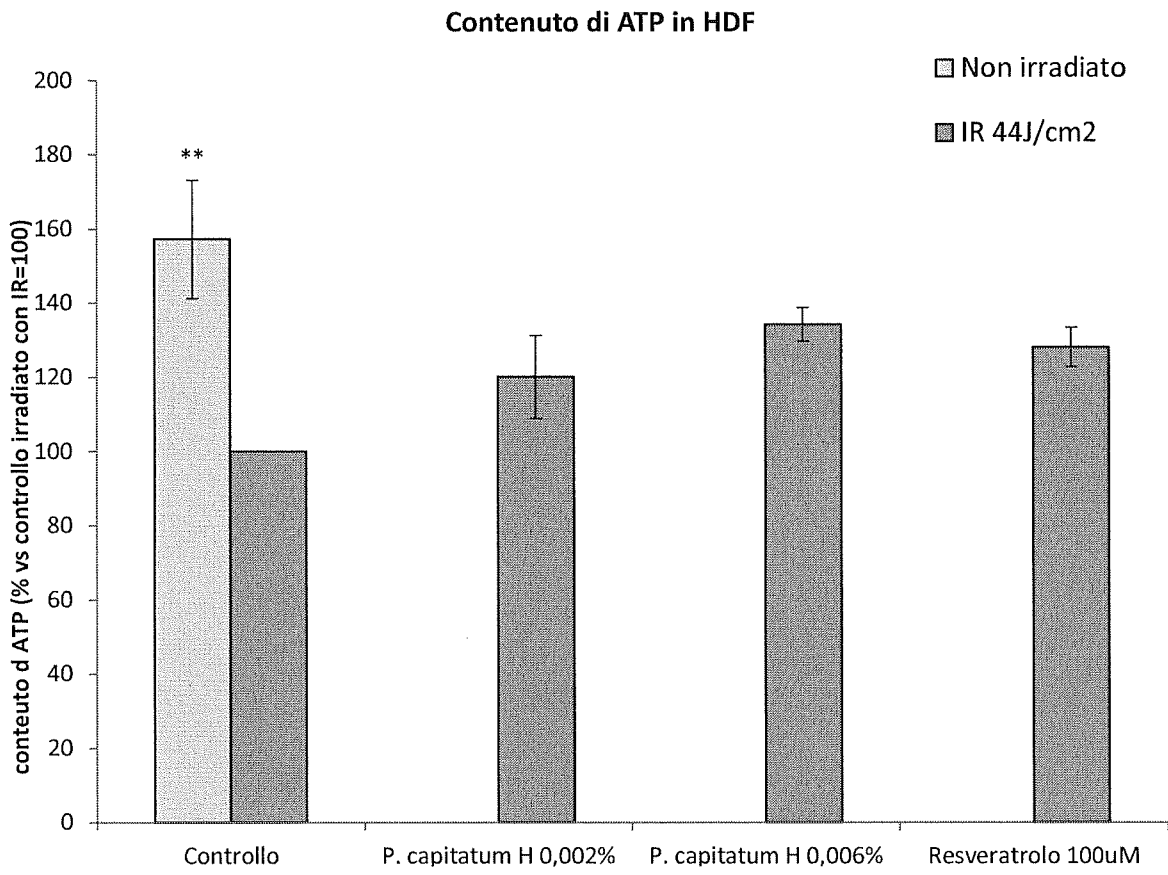


FIGURA 3.

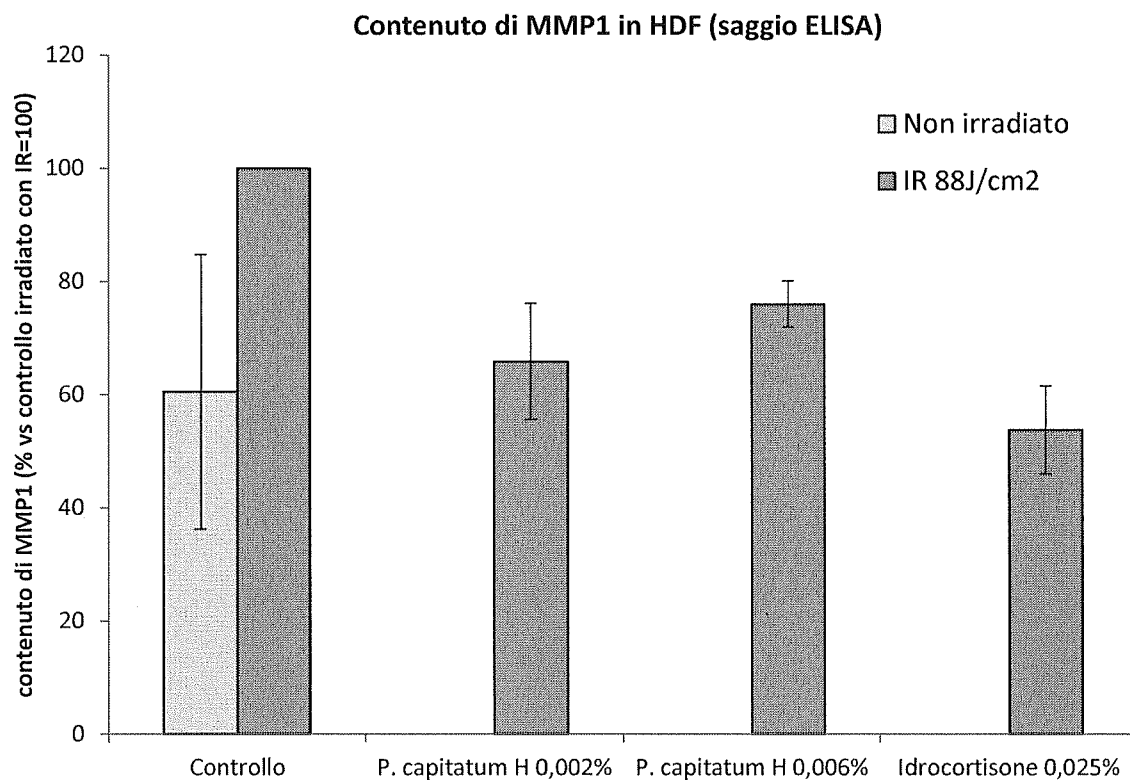


FIGURA 4.

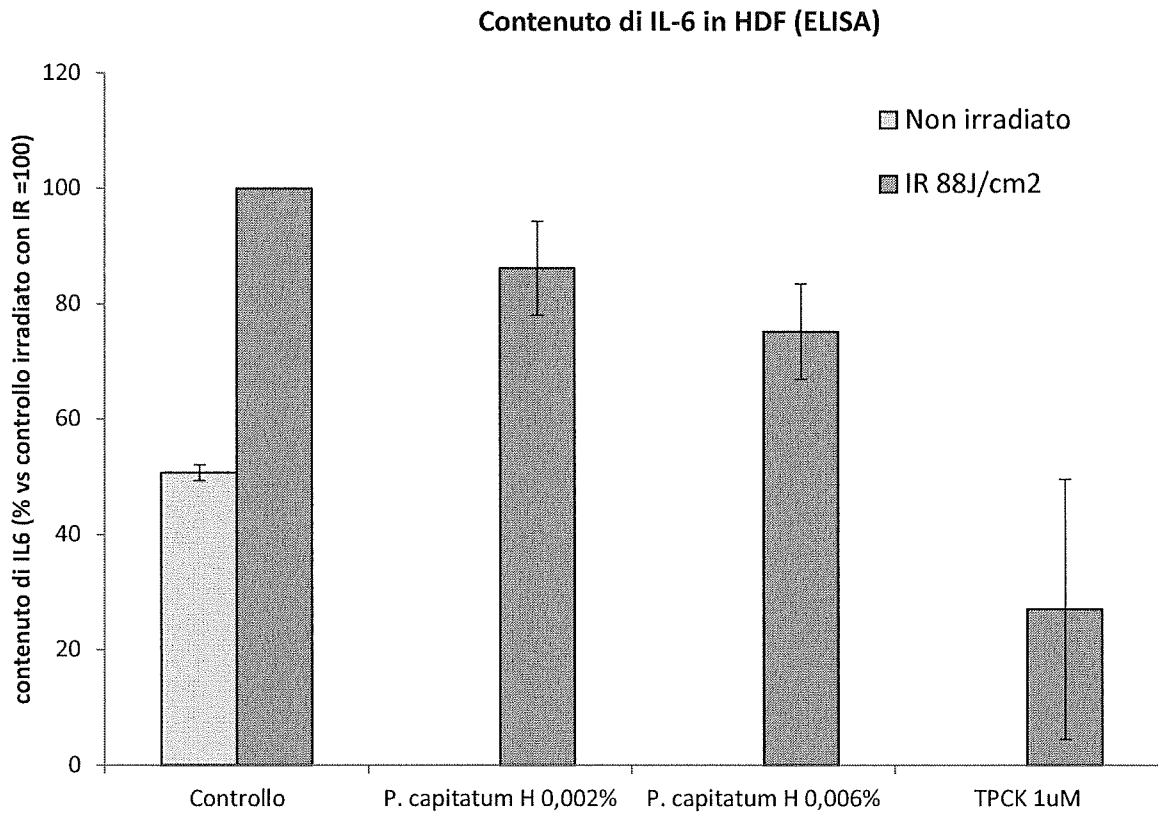


FIGURA 5.

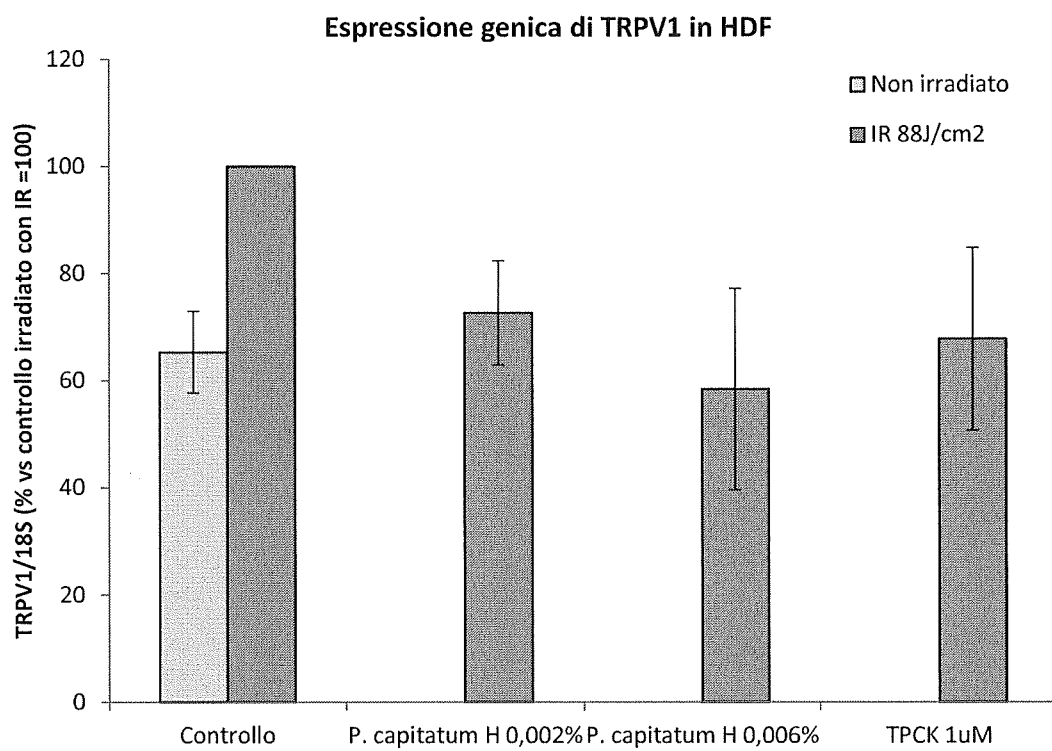


FIGURA 6.

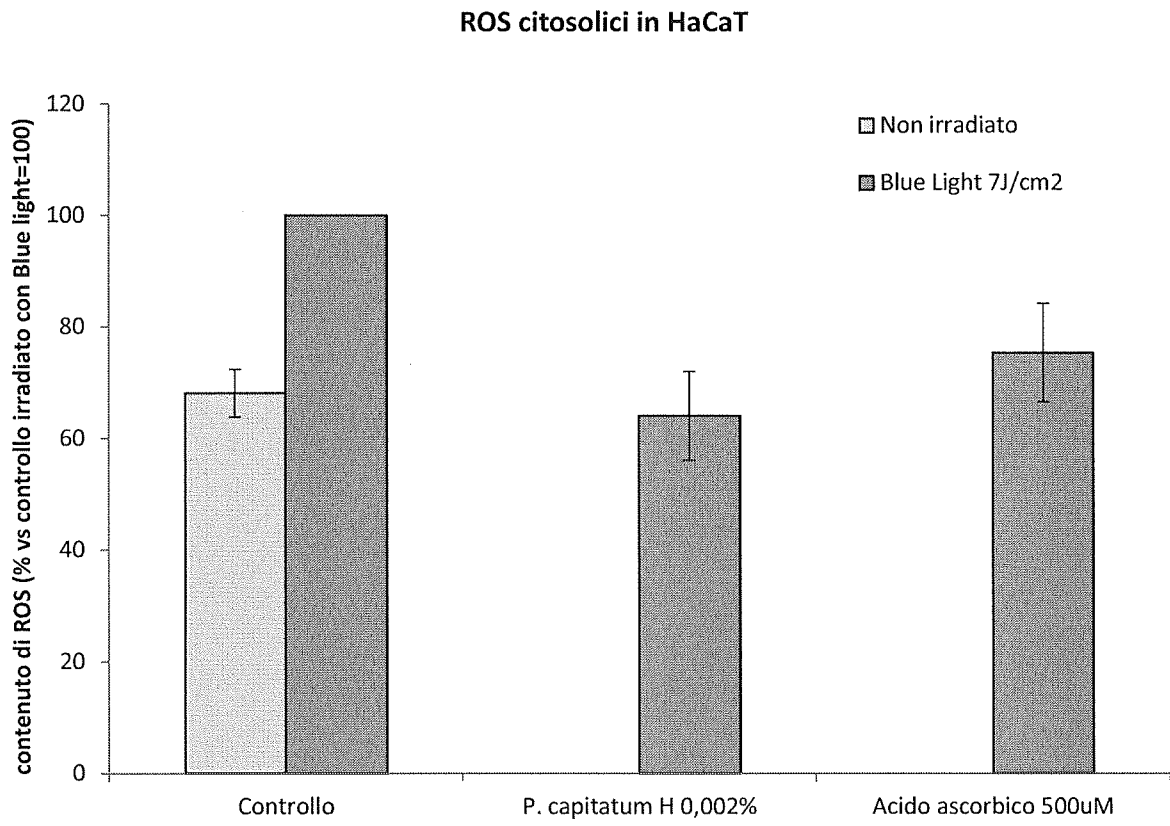


FIGURA 7.

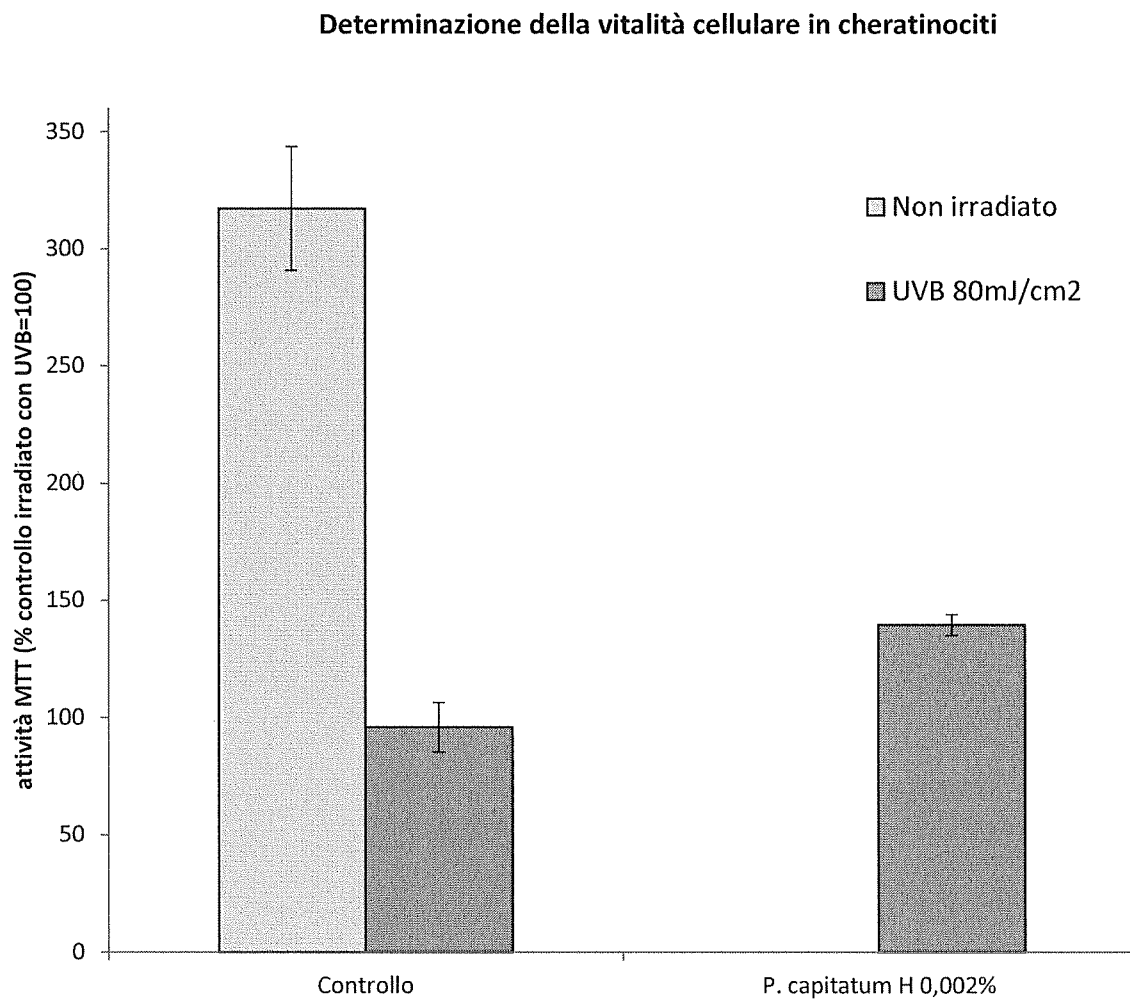


FIGURA 8.

