



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 361**

51 Int. Cl.:
A61K 36/235 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04722572 .7**

96 Fecha de presentación : **23.03.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1615651**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.01.2006**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de ferutinina a partir de plantas del género *Ferula*.**

30 Prioridad: **04.04.2003 IT MI03A0661**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2011

73 Titular/es: **INDENA S.p.A.**
Viale Ortles, 12
20139 Milano, IT

72 Inventor/es: **Bombardelli, Ezio;**
Fontana, Gabriele;
Cristoni, Aldo y
Mercalli, Enrico

74 Agente: **Lazcano Gainza, Jesús**

ES 2 367 361 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de ferutinina a partir de plantas del género *Ferula*

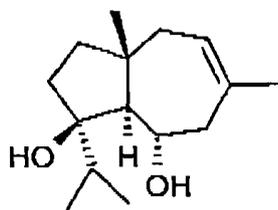
5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a extractos vegetales de *Ferula spp* y a un procedimiento para aislar ferutinina a partir de dichos extractos.

10 **Antecedentes de la invención**

Diversas plantas del género *Ferula* contienen terpenos con actividad estrógena, conocidos también como fitoestrógenos, es decir sustancias que regulan funciones hormonales y son aparentemente una alternativa válida para el uso de hormonas sintéticas en el tratamiento de trastornos y el síndrome premenstruales relacionados con la menopausia y el envejecimiento. Extractos de algunos tipos de *Ferula* se usaron en tiempos antiguos como anticonceptivos y en el tratamiento de trastornos menopáusicos e impotencia. Recientemente, se han dado a conocer extractos alcohólicos de *Ferula asafoetida L.* (documento WO 0230438) como fármacos anticancerígenos.

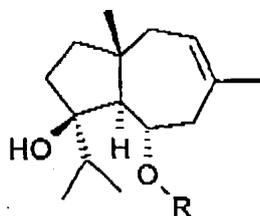
Los compuestos más abundantes en plantas del género *Ferula* son derivados de jaeschkenadiol (II):



(II)

20

en particular ésteres de daucano que tienen la fórmula general (I)



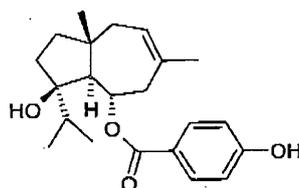
(I)

25

Los ésteres de daucano son compuestos conocidos y se dan a conocer por ejemplo en *Phytochemistry*, vol. 37, n.º 3, páginas 597 - 623, 1994. En la fórmula (I) R es un residuo de acilo alifático saturado o insaturado, lineal o ramificado, o un residuo de acilo aromático opcionalmente sustituido. Ejemplos de grupos R son iso-valeroilo, angeloilo, benzoilo, p-hidroxibencilo, veratroilo o cinamoilo.

30

Los ésteres de daucano de *Ferula spp* son moduladores de estrógenos similares a los SERM (moduladores selectivos del receptor de estrógenos); entre ellos, la ferutinina (Ia) muestra una actividad estrógena marcada, mientras que los otros tienen una actividad bastante leve.



(Ia)

35

En particular, la ferutinina es un agonista del receptor de estrógenos alfa (ER α) y un agonista/ antagonista del receptor de estrógenos beta (ER β). También se ha demostrado que la ferutinina tiene una unión superior a los receptores de estrógenos que el tamoxifeno.

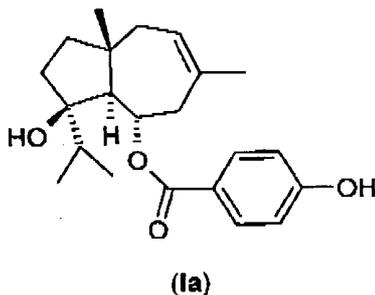
Existe por tanto la necesidad de obtener extractos enriquecidos con ferutinina u optimizar la extracción de ferutinina en la forma pura a partir de materiales vegetales que contienen sus precursores.

5 Se conoce un procedimiento que comprende la hidrólisis de un extracto total de ésteres de daucano para dar jaeschkenadiol bruto y la posterior reesterificación de jaeschkenadiol con ácido p-hidroxibenzoico adecuadamente protegido, por ejemplo con ácido p-acetoxibenzoico, de la bibliografía (J. Org. Chem. USSR (traducción al inglés); EN; 28; 10; 1992; 1666-1673). No obstante, este procedimiento proporciona rendimientos bastante pobres (aproximadamente el 45%), principalmente debido a reacciones de transesterificación competitivas.

Descripción detallada de la invención

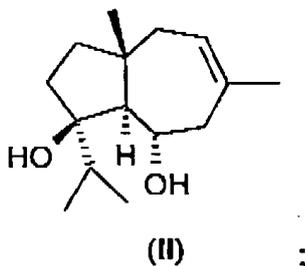
10 Se ha encontrado ahora que el uso de ácido p-pivaloiloxibenzoico como agente de esterificación permite evitar reacciones competitivas responsables de los bajos rendimientos de conversión.

El objeto de la presente invención es por tanto un procedimiento para la preparación de ferutinina (Ia)

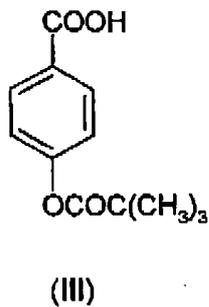


15 que comprende las siguientes etapas:

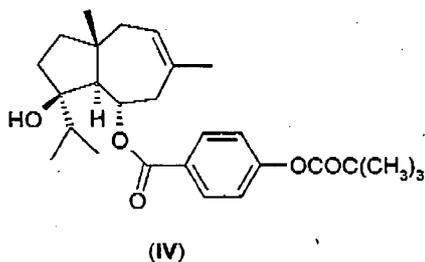
- a) extracción de ésteres de daucano de *Ferula spp*;
- b) hidrólisis básica de ésteres de daucano para dar jaeschkenadiol (II)



20 c) esterificación de jaeschkenadiol (II) con ácido p-pivaloiloxibenzoico (III)



para dar p-pivaloilferutinina (IV)



d) hidrólisis de p-pivaloilferutinina (IV) para dar ferutinina.

“Ésteres de daucano” significa compuestos de fórmula general (I) tal como se definió anteriormente; dichos ésteres pueden obtenerse mediante extracción de los rizomas o partes aéreas de *Ferula spp*, preferiblemente *Ferula communis* y *Ferula hermonis*, con métodos convencionales, por ejemplo mediante extracción con alcoholes inferiores. Partiendo de los rizomas de *Ferula hermonis* que contienen éster benzoico de jaeschkenadiol y ferutinina (no pueden separarse fácilmente mediante cromatografía) en una razón de 1:1, puede aislarse ferutinina pura extrayendo las raíces con metanol, tratando el extracto con KOH al 5% y extrayendo de nuevo el extracto saponificado con hidrocarburos alifáticos, éteres, ésteres o disolventes clorados.

Alternativamente, los ésteres de daucano pueden obtenerse mediante extracción con CO₂ supercrítico a temperaturas que oscilan entre 35 y 65°C, preferiblemente a 45°C, y presiones que oscilan entre 200 y 260 bar, preferiblemente a 245 bar. En el separador (o en los separadores) la temperatura oscila entre 25 y 45°C y la presión es de aproximadamente 50 bar. En estas condiciones experimentales no se extraen los materiales pegajosos, que hacen que sea difícil la recuperación de los compuestos deseados. El residuo puede someterse directamente a saponificación según lo que se notifica en los ejemplos.

Se esterifica jaeschkenadiol con ácido p-pivaloiloxibenzoico y se trata, en el mismo disolvente de reacción, con una base, preferiblemente una amina primaria, más preferiblemente etilendiamina, para dar ferutinina pura. Según una realización preferida de la invención, las etapas c) y d) se llevan a cabo convenientemente en secuencia sin la recuperación de p-pivaloilferutinina intermedia.

Un objeto adicional de la presente invención es el uso cosmético de ferutinina, p-pivaloilferutinina y extractos, de *Ferula spp*, preferiblemente extractos de *Ferula communis* y *Ferula hermonis* tal como se define en las reivindicaciones 8-10.

Cuando se aplican sobre la piel, los extractos de *Ferula spp* y ferutinina demostraron sorprendentemente que pueden aumentar la biosíntesis de colágeno y ejercer una acción de hidratación, tónica y trófica, proporcionando así firmeza y elasticidad. Además, reducen la secreción de sebo y desempeñan un papel notable en el control del hirsutismo y la virilización facial. Por tanto, las composiciones que contienen extractos de *Ferula spp* o ferutinina pueden usarse en el campo cosmético o dermatológico para el tratamiento de arrugas superficiales o profundas u otros antiestetismos, así como para el tratamiento de diversas formas de acné y seborrea.

Los extractos de *Ferula spp* y ferutinina pueden formularse en forma de cremas, geles y lociones en mezcla con excipientes convencionales, por ejemplo los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, XVII ed., Mack Pub., N.Y., EE.UU., preferiblemente en presencia de lecitina de soja o fosfolípidos, tales como lauroilfosfatidilcolina y miristoilfosfatidilcolina, que pueden incorporarse en emulsiones de agua/aceite y aceite/agua o en emplastos transdérmicos.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención en mayor detalle.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Aislamiento de jaeschkenadiol a partir de raíces de *Ferula hermonis*

Se extraen 250 g de raíces de *Ferula hermonis* finamente molidas (distribución de tamaño de partícula: 2 mm) mediante percolación con MeOH 11. Tras la maceración durante dos días y percolación del disolvente, se repite la operación (4 x 11), para obtener 112,2 g de extracto de metanol (45%). Se monitoriza el agotamiento del fármaco mediante CCF (éter de petróleo/EtOAc 8/2, ferutinina R_f: 0,14).

Se somete a reflujo el extracto de metanol con 513 ml de una disolución de KOH al 10%-metanol. Tras 1 h, el análisis de CCF (éter de petróleo-EtOAc 8/2, ferutinina R_f: 0,14; R_f de jaeschkenadiol: 0,31) muestra que se ha completado la reacción. Tras enfriar, se diluye la mezcla de reacción con agua (500 ml) y se extrae con éter de petróleo (4 x 500 ml). Se lavan las fases de éter de petróleo combinadas con salmuera, se secan y se evaporan. Se lava el residuo semicristalino resultante con éter de petróleo frío (temperatura del refrigerador) para obtener 7,5 g de jaeschkenadiol cristalino. Se purifican las aguas madres mediante cromatografía (50 g de gel de sílice, éter de petróleo-EtOAc 95:5), para obtener α -bisabolol (870 mg), una mezcla de α -bisabolol y jaeschkenadiol, y jaeschkenadiol puro (3,4 g tras la cristalización). Se junta la mezcla de jaeschkenadiol y α -bisabolol con el agua madre y se cromatografía (50 g de gel de sílice, éter de petróleo-EtOAc 95:5), para obtener 1,95 g de jaeschkenadiol cristalino (rendimiento global: 12,85 g, 5,1%).

El compuesto tiene las siguientes propiedades fisicoquímicas y espectroscópicas:

espectro IR (KBr, cm⁻¹): 3339, 2965, 2905, 2875, 1470, 1375, 1047, 968, 858

espectro de masas (C.I.)

$M^+ + 1 - H_2O = 221$; $M^+ + 1 - 2H_2O = 203$

5 espectro de 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ : H9 5,43 m, H2 3,9 m, H14 1,78 s, H15 1,00s, H12 0,95 d J 4,98, H13 0,91 d J 5,13.

Ejemplo 2 - Aislamiento de jaeschkenadiol a partir de raíces de *Ferula communis*

10 Se extraen 250 g de raíces de *Ferula communis* finamente molidas (distribución de tamaño de partícula: 2 mm) mediante percolación usando MeOH 11. Tras la maceración durante dos días y percolación del disolvente, se repite la operación (4 x 11); se concentran los extractos de metanol hasta un volumen igual al peso de las raíces molidas y se añade el extracto con KOH al 10% (10 ml). Se somete a reflujo la disolución alcalina durante 2 horas, entonces se enfría y se extrae de nuevo tres veces con 200 ml de n-hexano. Se monitoriza el agotamiento del fármaco mediante CCF (éter de petróleo/EtOAc 8/2).

15 Se lavan las fases de hexano combinadas con salmuera, se secan y se evaporan. Se lava el residuo semicristalino resultante con éter de petróleo frío (temperatura del refrigerador), para obtener 3,5 g de jaeschkenadiol cristalino. Se purifica el agua madre según el ejemplo 1. Rendimiento: 0,8 g de jaeschkenadiol que tiene las mismas propiedades fisicoquímicas que las del ejemplo 1.

Ejemplo 3 - Aislamiento de jaeschkenadiol a partir de partes aéreas de *Ferula communis*

25 Se extrae 1 kg de partes aéreas de *Ferula communis* finamente molidas con dióxido de carbono a 45°C y 245 bar en un aparato para la extracción con gases supercríticos. En el separador (o en los separadores) la temperatura oscila entre 25 y 45°C y la presión es de aproximadamente 50 bar. En estas condiciones no se extraen los materiales pegajosos que hacen que sea difícil recuperar los compuestos deseados. Se llave el residuo, que contiene sólo compuestos lipófilos y agua, a metanol y se trata con bases para hidrolizar ésteres de jaeschkenadiol, tal como se notifica en los ejemplos 1 y 2. Tras la purificación, se obtienen 5,1 g de compuesto puro que tiene las mismas características del producto del ejemplo 1.

Ejemplo 4 - Síntesis de ácido p-pivaloiloxibenzoico

35 Se disuelve el ácido 4-hidroxibenzoico (114,5 g, 829 mmoles) con agitación en piridina (1,15 l), enfriando hasta $T < 5^\circ C$ en un baño con hielo. A la disolución resultante se le añaden 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 0,3 equivalentes, 248,8 mmoles, 30,4 g) y cloruro de pivaloilo (3 equivalentes, 2,487 mol, 300 g, 293,6 ml). Se deja que se caliente la disolución hasta temperatura ambiente y se deja con agitación durante 2 h, entonces se le añade agua (2,29 l) (reacción exotérmica: enfriar la disolución en un baño con hielo) y se deja con agitación durante 3 h adicionales.

40 Se vierte la disolución en un embudo separador y se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 750 ml). Se lavan las fases de cloruro de metileno combinadas con H_2SO_4 2 M (4 x 750 ml) y una disolución de NaCl saturada (1 x 1150 ml), entonces se seca sobre Na_2SO_4 (60 g).

45 Se filtra la disolución a través de filtro de papel y se elimina mediante evaporación el disolvente a vacío para obtener un residuo que se tritura con éter de petróleo a $30^\circ - 50^\circ$ (3 x 400 ml), se filtra mediante succión y se seca a vacío en una secadora estática a 45°C durante 15 h. Se obtienen 130,5 g de producto con las siguientes características espectroscópicas.

50 Espectro IR (KBr, cm^{-1}): 3680, 2978, 2361, 1753, 1686, 1603, 1427, 1289, 1204, 1163, 1103.

Espectro de masas (C.I.): $M^+ + 1 = 223$

Espectro de 1H -RMN (300 MHz, D-DMSO) δ H3=7 8,00 d J=8,48, H4=6 7,23 d J=8,55, CH3 1,34 s.

Ejemplo 5 - Síntesis de ferutinina a partir de jaeschkenadiol

60 Se disuelve jaeschkenadiol (100 g, 419,5 mmoles) con agitación a temperatura ambiente en CH_2Cl_2 (600 ml). A la disolución resultante se le añade ácido p-pivaloiloxibenzoico (1,4 equivalentes, 587,3 mmoles, 130,5 g) y DMAP (0,3 equivalentes, 125,9 mmoles, 15,4 g). Se deja la disolución con agitación durante 10 min. hasta completar la disolución de los reactivos, entonces se añade N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 1,8 equivalentes, 755,1 mmoles, 155,8 g). Se completa la reacción tras 2 h.

65 Se concentra la disolución en 2 volúmenes (200 ml) y se diluye con 5 volúmenes de CH_3CN (500 ml), después de esto se elimina mediante filtración el precipitado de diciclohexilurea y se lava con 5 volúmenes más de CH_3CN (2 x 250 ml). Se vierten las fases orgánicas combinadas en un embudo separador, se extraen con Na_2CO_3 al 10% p/v (2

x 250 ml) y con una disolución saturada de NaCl (1 x 250 ml), entonces se secan sobre Na₂SO₄ (100 g). Se elimina mediante filtración el Na₂SO₄ y se evapora el disolvente a vacío para dar 360 g del compuesto (IV), que tiene las siguientes características espectroscópicas:

5 ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,09 (d, J=9,0 Hz, H3'-H5'), 7,20 (d, J=8,7 Hz, H2'-H6'), 5,60 (ta, J=4,7 Hz, H9), 5,35 (td, J=10,4-2,9 Hz, H6), 2,58 (dd, J=13,1-10,9 Hz, H7b), 2,34 (dd, J=14,1-2,3 Hz, H7a), 2,07 (m, H10), 2,04 (d, J=2,7 Hz, H5), 1,97 (d, J=9,7 Hz, H2a), 1,89 (m, H11), 1,86 (s, H14), 1,63 (m, H2b), 1,57 (m, H3a), 1,41 (s, C(CH₃)₃), 1,30 (m, H3b), 1,14 (s, H15), 0,99 (d, J=6,9 Hz, H12), 0,89 (d, J=6,7 Hz, H13).

10 Se disuelve el compuesto (IV) con agitación a temperatura ambiente en 2 l de CH₂Cl₂. A la disolución resultante se le añade etilendiamina (10 equivalentes, 280 ml). Se completa la reacción tras 3 h. Se enfría la disolución hasta 0°C, se vierte en un embudo separador, entonces se lava con H₂SO₄ 3 M a 0°C (2 x 750 ml, reacción exotérmica) y una disolución de NaCl saturada (1 x 500 ml). Se seca la fase orgánica sobre Na₂SO₄ (100 g), se filtra y se evapora hasta sequedad. Se carga el residuo (230 g) sobre una columna de gel de sílice (2,5 kg) equilibrada con 5,8 l de una mezcla de hexano:AcOEt=9:1 y se eluye con 70 l de la misma mezcla. Se juntan las fracciones que contienen el producto, se elimina mediante evaporación el disolvente a vacío y se seca el producto en una secadora estática a 45°C durante 24 h.

20 Se obtienen 139 g (92,4%) de producto que tiene las siguientes características espectroscópicas:

Espectro IR (KBr, cm⁻¹): 3410, 1686, 1655, 1608, 1593, 1560, 1279, 1165, 1099, 771.

Espectro de masas (C.I.): M⁺+1 - H₂O=341

25 Espectro de ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ H3'=7' 7,94 d J=8, 4'=6' 6,88 d J=8, H9 5,56 m, H2 5,23 dt J=11, H14 1,80 sa, H15 1,10 s, H13 0,94 d J=6,5, H 12 0,82 d J=6,5.

Ejemplo 6 - Preparación de un extracto de *Ferula hermonis*

30 Se extrae 1 kg de la planta entera *Ferula hermonis* tres veces con 5 volúmenes de acetona. Se concentran los extractos de acetona combinados hasta 0,5 partes en comparación con el peso de la biomasa de partida y se diluyen con 2 partes de agua. Se ajusta la disolución acuosa a pH 7,8 con KOH diluido, en presencia de hexano, con fuerte agitación. Se descarta la fase de hexano, se acidifica la acuosa a pH 5 y se extrae de nuevo con n-hexano. Se concentra la fase de hexano que contiene ferutinina hasta sequedad para dar 52 g de extracto que contiene aproximadamente el 35% de ferutinina.

Ejemplo 7 - Formulación que contiene ferutinina para el tratamiento de arrugas superficiales

40 Se incorpora ferutinina en una crema que tiene la siguiente composición:

| | |
|---------------------------------------------------|----------------|
| Ferutinina | 0,20 g |
| Carbómero 934 (Carbopol 934 P - Goodrich) | 0,60 g |
| Propilenglicol | 3,00 g |
| Imidazolinilurea | 0,30 g |
| Kathon CG | 0,05 g |
| EDTA disódico | 0,10 g |
| Esteroles de soja PEG-5 (Generol 122 E5 - Henkel) | 2,00 g |
| Octildodecanol (Eutanol G - Henkel) | 4,00 g |
| Aceite de germen de trigo | 4,00 g |
| Aceite de silicona 350 cps | 0,50 g |
| Estearato de glicerilo (Cutine GMS - Henkel) | 7,00 g |
| Polisorbato 60 (Tween 60 - ICI) | 5,00 g |
| Tocoferol | 0,20 g |
| Palmitato de ascorbilo | 0,10 g |
| Disolución de NaOH al 10% | 2,00 g |
| Perfume (186909 - Dragoco) | 0,20 g |
| Agua purificada | hasta 100,00 g |

Ejemplo 8 - Formulación que contiene un extracto puro de *Ferula hermonis* con un contenido en ferutinina del 30% y un contenido en éster benzoico de jaeschkenadiol del 20%

| | |
|-------------------------------------------|--------|
| Extracto de <i>Ferula hermonis</i> | 0,5 g |
| Carbómero 934 (Carbopol 934 P - Goodrich) | 0,60 g |
| Propilenglicol | 3,00 g |
| Imidazolinilurea | 0,30 g |

| | |
|---------------------------------------------------|----------------|
| Kathon CG | 0,05 g |
| EDTA disódico | 0,10 g |
| Esteroles de soja PEG-5 (Generol 122 E5 - Henkel) | 2,00 g |
| Octildodecanol (Eutanol G - Henkel) | 4,00 g |
| Aceite de germen de trigo | 4,00 g |
| Aceite de silicona 350 cps | 0,50 g |
| Estearato de glicerilo (Cutine GMS - Henkel) | 7,00 g |
| Polisorbato 60 (Tween 60 - ICI) | 5,00 g |
| Tocoferol | 0,20 g |
| Palmitato de ascorbilo | 0,10 g |
| Disolución de NaOH al 10% | 2,00 g |
| Perfume (186909 - Dragoco) | 0,20 g |
| Agua purificada | hasta 100,00 g |

Ejemplo 9 - Gel que contiene ferutinina

| | |
|--------------------------------------------------|--------------|
| Ferutinina | 0,30 g |
| Imidazolinilurea | 0,30 g |
| Metilparabeno | 0,20 g |
| Hidroxietilcelulosa (Natrosol 250 HHX - Aqualon) | 2,00 g |
| Agua purificada | hasta 100 ml |

5 Ejemplo 10 - Formulación cosmética que contiene extracto de *Ferula spp*

| | |
|--------------------------------------------------|--------------|
| Extracto de <i>Ferula hermonis</i> | 0,5 g |
| Imidazolinilurea | 0,30 g |
| Metilparabeno | 0,20 g |
| Hidroxietilcelulosa (Natrosol 250 HHX - Aqualon) | 2,00 g |
| Agua purificada | hasta 100 ml |

EXPERIMENTACIÓN**10 Eficacia del producto**

Se determinó la eficacia de la crema del ejemplo 7 en un estudio doble ciego con 40 voluntarias, de edad que oscilaba entre 39 y 56 años, evaluando los efectos sobre la firmeza y la elasticidad de la piel y sobre la rugometría. El estudio iba precedido de un periodo de acondicionamiento de siete días, en el que el sujeto tuvo que abstenerse del uso de productos hidratantes, cremas solares y maquillajes líquidos y evitar tratamientos bronceadores y una exposición excesiva a los rayos UV.

Se dejó que los sujetos usaran productos de cuidado de los labios y ojos convencionales, polvos faciales y jabones no hidratantes.

Se dividieron aleatoriamente los sujetos en dos grupos, uno tratado con una crema placebo y uno tratado con la crema del ejemplo 7. Se aplicaron las cremas en la cara en cantidades normalizadas (0,5 g, es decir 0,5 cm de crema que sale del tubo) dos veces al día, por la mañana y por la noche. Antes y después de cinco semanas de tratamiento se llevaron a cabo las mediciones siguientes.

Antes de cada sesión de medición todos los sujetos permanecieron treinta minutos en una cámara climática a 23°C y el 50% de humedad relativa. Cada sesión comprendía tres mediciones con corneómetro, tres mediciones con cutómetro, y una impresión en silicona de la zona periorbital, sobre las zonas cutáneas indicadas a continuación.

Los 40 sujetos completaron el estudio.

Cutometría

El cutómetro es un dispositivo disponible comercialmente (Cutometer SEM 575, Courage & Khazaka, Alemania) para medir las propiedades mecánicas de la piel de una manera no invasiva. En más detalle, se mide la deformación vertical de la superficie de la piel cuando se somete a una presión negativa de 500 mm de Hg a través de una abertura de 2 mm de una sonda. Se mide ópticamente la longitud de penetración de la piel en la sonda con 0,01 mm de precisión. Se conecta la sonda con un ordenador que registra la deformación de la piel a lo largo del tiempo. A partir de la curva resultante, pueden extrapolarse diversas variables para evaluar el comportamiento viscoso, elástico y viscoelástico de la piel.

Se registraron los siguientes parámetros:

distensión inmediata (U_e), medida a los 0,1 segundos;

distensión retrasada (U_v);

5

distensión final (U_f), medida a los 10 segundos; y

retracción inmediata (U_r).

10

Se llevó a cabo la prueba usando el cutómetro en ambas mejillas.

No se observaron variaciones significativas en el grupo de placebo. La distensión retrasada (U_v) en el grupo tratado disminuyó significativamente (16%, $p < 0,05$) tras 5 semanas de tratamiento. Este parámetro refleja el comportamiento de la dermis y las propiedades viscoelásticas de la piel. Tras 5 semanas, también se observó un cambio significativo (-12%, $p < 0,05$) en U_e , que está influido principalmente por las propiedades mecánicas y de hidratación de la capa córnea. La disminución en U_v y U_e , junto con la estabilidad de U_r , muestra un aumento de la firmeza de la piel.

15

Corneometría

20

El aspecto suave y liso de la piel depende principalmente de la presencia de una cantidad adecuada de agua en la capa córnea.

El corneómetro es un dispositivo disponible comercialmente (Corneometer CM 825 Combi 3, Courage & Khazaka, Alemania) que mide los cambios de capacitancia que resultan de los cambios en la hidratación de la piel.

25

Se llevó a cabo la prueba usando el corneómetro en ambas mejillas.

Tras 5 semanas, se observó un cambio significativo en el grupo tratado, en particular, aumento de la hidratación de la piel en un 17,5%, mientras que en el grupo placebo disminuyó en un 3%.

30

Rugometría

Se llevaron a cabo impresiones de silicona en sujetos en posición sentada. Se obtuvieron las impresiones (2 x 5 cm) al inicio y después de 5 semanas, usando "material de impresión en silicona Silflo" (disponible de Flexico, R.U.).

35

Entonces se analizaron las impresiones con el sistema analizador de la imagen de la piel usando el software Quantirides - Monaderm, que distingue el microrrelieve cutáneo de arrugas medianas y arrugas profundas y calcula su número y profundidad; finalmente, se obtiene el valor de la zona de arrugas total.

40

Tras 5 semanas, se observaron cambios significativos en el grupo tratado. En particular, se observó una disminución del 21,3% ($p < 0,05$) en la zona de arrugas, mientras que en el grupo de placebo la disminución fue del 0,4%.

Se ha observado una disminución estadísticamente significativa principalmente en el número y profundidad de arrugas medianas y profundas.

45

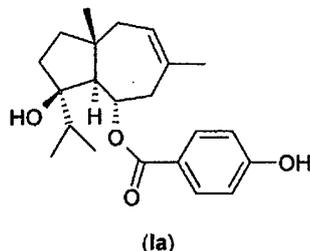
Conclusión

El estudio permitió concluir que la crema del ejemplo 7 tiene una buena actividad cosmética en el tratamiento de la piel con signos de crono- y fotoenvejecimiento, ya que aumenta la firmeza e hidratación de la piel y disminuye la zona arrugada media, en particular las micro- y macrorrugosidades profundas. La piel parecía visualmente más firme y más lisa.

50

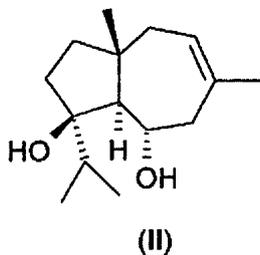
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de ferutinina (Ia)

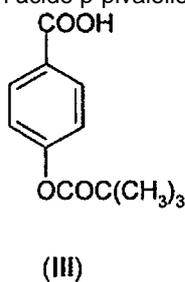


5 que comprende las siguientes etapas:

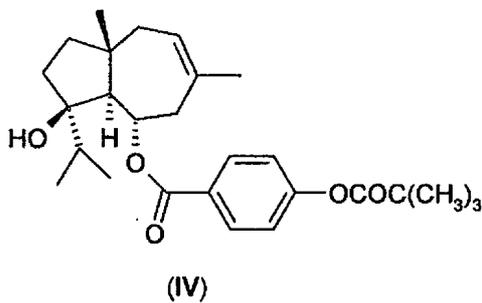
- a) extracción de ésteres de daucano de *Ferula spp*;
 b) hidrólisis básica de ésteres de daucano para dar jaeschkenadiol (II)



- 10 c) esterificación de jaeschkenadiol (II) con ácido p-pivaloiloxibenzoico (III)



para dar p-pivaloilferutinina (IV)



- 15 d) hidrólisis de p-pivaloilferutinina (IV) para dar ferutinina.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los ésteres de daucano se extraen de *Ferula communis*.
 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los ésteres de daucano se extraen de *Ferula hermonis*.
 20 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que los ésteres de daucano se extraen con dióxido de carbono supercrítico a temperaturas que oscilan entre 35 y 65°C y presiones que oscilan entre 200 y 260 bar.
 25 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la temperatura es de 45°C.

6. Procedimiento según la reivindicación 4 ó 5, en el que la separación se lleva a cabo a temperaturas que oscilan entre 25 y 45°C y presiones que oscilan entre 45 y 55 bar.
- 5 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que las etapas c) y d) se llevan a cabo en secuencia sin recuperar el compuesto (IV).
8. Uso de extractos de *Ferula spp* para el tratamiento cosmético de las arrugas.
9. Uso de ferutina para el tratamiento cosmético de las arrugas.
- 10 10. Uso de p-pivaloiloxiferutina para el tratamiento cosmético de las arrugas.