

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 357**

51 Int. Cl.:
A61K 35/74 (2006.01)
A61K 36/06 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
C12N 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03733913 .2**
 96 Fecha de presentación: **01.05.2003**
 97 Número de publicación de la solicitud: **1503776**
 97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2005**

54

Título: **PROCEDIMIENTO DE MEJORA DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS DE ORIGEN VEGETAL.**

30

Prioridad:
02.05.2002 US 377582 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.02.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.02.2012

73

Titular/es:
**E-L MANAGEMENT CORP.
767 FIFTH AVENUE
NEW YORK, NY 10153, US**

72

Inventor/es:
**CIOCA, George;
IONITA-MANZATU, Vasile;
GEORGE, Liliana;
GIACOMONI, Paolo;
MAMMONE, Thomas;
COLLINS, Donald, F.;
MAES, Daniel, H;
BEVACQUA, Andrew, J.;
GEDEON, Harvey;
FTHENAKIS, Christina y
TADLOCK, Charles, C.**

74

Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 375 357 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).

DESCRIPCION

Procedimiento de mejora de la actividad biológica de extractos de origen vegetal.

Campo de la invención

5 La invención se refiere a composiciones cosméticas y farmacéuticas y a procedimientos de preparación de las mismas. Más específicamente, la invención se refiere a procedimientos de preparación de composiciones cosméticas y farmacéuticas con actividad biológica mejorada.

Antecedentes de la invención

10 Durante los últimos años, los consumidores de productos para el cuidado de la piel son cada vez más conscientes del contenido de los productos que usan. La demanda de productos basados en materiales "naturales" ha aumentado significativamente. Durante miles de años las plantas han sido la fuente de numerosos remedios tradicionales y han proporcionado la base para el desarrollo de productos farmacéuticos, por ejemplo, el mejor analgésico, la aspirina, es una modificación del derivado del sauce llorón ácido salicílico y, para el tratamiento del cáncer, el Taxol procede, en última instancia, de los tejos (género *Taxus*). Ha surgido de nuevo el interés en el uso de materiales de origen vegetal para el tratamiento de la piel, que está relacionado con el deseo general de volver a una forma de vida más sencilla o más natural y de evitar materiales de origen humano o animal que podrían estar contaminados por materiales no aconsejables o que son considerados como no aconsejables por algunos consumidores u organismos gubernamentales.

15 Sin embargo, el uso de materiales de origen vegetal no está exento de dificultades. Frecuentemente una planta puede no producir grandes cantidades del compuesto de interés, dificultando la obtención de cantidades significativas para fines terapéuticos comerciales. Para mantener existencias suficientes de un material puede ser necesario recoger grandes volúmenes del material de origen vegetal en cuestión, lo cual, a su vez, puede producir daños medioambientales, desequilibrio ecológico o, en el peor de los casos, extinción final de la planta. Cuando la identidad del compuesto que exhibe la actividad deseada es conocida, a veces es posible preparar el compuesto sintéticamente, es decir, totalmente mediante rutas químicas, o preparar el compuesto deseado de forma semi-sintética, partiendo de un precursor fitoquímico más abundante y obteniendo el compuesto deseado mediante rutas químicas a partir del mismo. Sin embargo, cualquiera de estos procedimientos puede ser caro y, según la percepción de algunos individuos, puede hacer el producto final, en cierto modo, menos "natural". De hecho, en muchos casos, el producto natural se percibirá como muy superior a su equivalente sintético, a pesar de su supuesta igualdad química; por ejemplo, en el caso de una molécula asimétrica, la molécula obtenida de forma natural generalmente presentará solo un tipo de quiralidad, mientras que los compuestos químicos sintéticos presentarán todos los posibles tipos de quiralidad. Un muy buen ejemplo de la importancia del origen natural es la percepción casi universal de la superioridad de la vainilla natural en comparación con la vainilla artificial.

20 Recientemente, también ha sido posible obtener grandes cantidades de los compuestos fitoquímicos deseados mediante un cultivo de células vegetales del que se seleccionan las células que producen mayores cantidades del compuesto de interés o transformación genética de las células hospedadoras que han proliferado más fácilmente, tales como las bacterias, con genes de células vegetales para permitir que el hospedador produzca material vegetal. Sin embargo, también hay un segmento de la población que desaprueba, por motivos medioambientales o teológicos, este medio para obtener compuestos químicos deseados.

25 Por tanto, actualmente existe una clara necesidad de medios para mejorar la disponibilidad de compuestos de origen vegetal biológicamente activos de una forma que mantengan el carácter natural del producto considerado en su conjunto. La presente invención proporciona ahora un medio para aumentar la actividad biológica de extractos vegetales, aumentando así de forma eficaz la disponibilidad del compuesto de interés.

Resumen de la invención

30 La presente invención se refiere a un procedimiento, en el presente documento denominado bioconversión, de modulación de una actividad biológica seleccionada de un material que se encuentra en la naturaleza que tiene una o más actividades biológicas o propiedades bioquímicas en un extracto adecuado del material natural. El procedimiento de la invención comprende la incubación de los extractos en presencia de una levadura u otros micro-organismos adecuados, en condiciones aeróbicas adecuadas, durante un periodo de tiempo suficiente para aumentar, o alterar favorablemente de otro modo, la actividad seleccionada. Preferiblemente, la actividad aumenta al menos el 100% respecto a la actividad de referencia del extracto sin tratar. La invención también se refiere al extracto modificado preparado mediante este proceso.

Descripción detallada de la invención

35 Ahora se ha descubierto, inesperadamente, que es posible mejorar o modular la actividad de un material que se encuentra en la naturaleza, por ejemplo, un extracto vegetal que ya presente actividad biológica, mediante un procesado relativamente sencillo del extracto en presencia de levadura. El proceso de bioconversión, como se denomina en el presente documento, es aeróbico y recuerda al tipo de proceso que transforma el vino en vinagre.

El proceso básico es como se indica a continuación: se selecciona un material que se encuentra en la naturaleza que presenta una o más actividades biológicas, o determinadas propiedades bioquímicas, tales como solubilidad o aroma. Por motivos de simplicidad, a lo largo de la memoria descriptiva y reivindicaciones, se sobreentenderá que "actividad biológica" abarca tanto verdadera actividad biológica como propiedades bioquímicas. A este respecto, también se debe sobreentender que aunque, en muchos casos, el efecto deseado es mejorar la actividad natural aumentando su potencia, en otros casos, especialmente cuando se modifica una propiedad bioquímica, la propiedad más que mejorarse se modula, porque la propiedad mejora cualitativamente pero no necesariamente cuantitativamente. Por tanto, a lo largo de la memoria descriptiva y especificaciones, el término "modular" o "modulación" pretende abarcar no sólo un aumento en la actividad biológica sino también un cambio cualitativo en una propiedad bioquímica. No es esencial conocer la identidad química del compuesto responsable de las actividades o propiedades bioquímicas. Se puede preparar un extracto del material natural mediante incubación del material con agua destilada, disoluciones acuosas de sales, aguas estructuradas, mezclas agua/alcohol o un aceite biológicamente aceptable, durante un periodo de tiempo suficiente para extraer materiales activos del material. Este periodo de tiempo puede ser tan breve como de varias horas y tan largo como de una semana o similar. Si la identidad de la molécula es conocida, entonces el análisis de la presencia de la molécula en el fluido de extracción indicará una extracción adecuada; sin embargo, si la identidad no es conocida, la observación del cambio de color del disolvente, o simplemente dejar el extracto hasta una semana, es un medio alternativo de garantizar una extracción razonablemente adecuada. Como alternativa al uso de un extracto crudo, el sustrato de partida puede ser un ingrediente básicamente puro, por ejemplo, un extracto vegetal comercialmente disponible o un componente vegetal purificado o un compuesto sintético puro que presente actividad biológica. Por motivos prácticos, todos estos tipos de materiales de partida se denominarán en el presente documento "extracto" y tales materiales también se denominarán "de origen vegetal" incluso si han sido preparados en última instancia sintéticamente. A continuación, el extracto se combina con una levadura u otro micro-organismo adecuado a temperatura ambiente, en condiciones bien oxigenadas, p. ej., agitación a 20-200 rpm con burbujeo de aire a 0,2-2 litros/minuto, durante un periodo de al menos aproximadamente 24 horas, preferiblemente más tiempo.

El proceso de bioconversión puede adoptar uno cualquiera de dos enfoques. El primero es un proceso en el cual el micro-organismo se incuba no solo con el extracto sino también con nutrientes de cultivo tradicionales. Durante una incubación de este tipo, la levadura se puede multiplicar. El segundo, y preferible, enfoque es incubar el micro-organismo en un entorno acuoso, en presencia solo del extracto, y básicamente en ausencia de cualquier nutriente adicional. En este procedimiento de procesado, la levadura no se multiplica, pero se acopla al procesado catabólico del material de partida. La bioconversión se monitoriza periódicamente en busca de señales de la estabilización de la actividad biológica, por ejemplo, una estabilización de pH, y, a continuación, la temperatura del sistema se eleva hasta aproximadamente 30-50°C, preferiblemente hasta aproximadamente 40-45°C, durante al menos aproximadamente 24 horas. En una realización, la temperatura se eleva entonces brevemente hasta 90-95°C durante un periodo de aproximadamente 5-10 minutos, lo cual rompe la levadura, liberando el contenido de las células. Alternativamente, las células se pueden romper mediante sonicación. A continuación, todo el sistema se enfría hasta temperatura ambiente y se filtra con tamaños de poro progresivamente decrecientes para eliminar los restos de levadura, dejando un extracto que presenta un nivel mejorado de actividad o propiedades bioquímicas modificadas en comparación con el extracto sin procesar.

Usando tales procedimientos, el nivel de actividad relevante aumenta de forma muy significativa, preferiblemente aumenta al menos aproximadamente el 25%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, lo más preferible al menos aproximadamente el 100% y, a menudo, aumenta significativamente más, es decir, de tres a diez veces. El organismo usado para el tratamiento biotecnológico, o bioconversión, del extracto puede ser cualquier micro-organismo que se usa normalmente con este fin. Un organismo especialmente útil es una levadura estándar para cerveza, *Saccharomyces cerevisiae*, pero también se puede usar otros micro-organismos aeróbicos, incluyendo, pero sin limitarse a, *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces pombe*, *Thermus aquaticus*, *Bacillus subtilis*, cianobacterias o archaeobacterias.

La concentración de micro-organismos usada en el proceso de conversión no es crítica y puede ser relativamente baja, es decir, de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 1% en peso de la mezcla, especialmente en la realización en la cual la levadura no se multiplica durante la conversión. También se pueden usar cantidades mayores que las anteriores. La cantidad de extracto de partida tampoco es crítica; sin embargo, si se desea evitar la proliferación de la levadura, la cantidad se debe controlar para que no proporcione suficientes nutrientes a la levadura como para permitir su multiplicación. Habitualmente, la cantidad será de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 10%, preferiblemente de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 5%, de material activo, dependiendo la concentración tanto del material de partida como de su solubilidad.

En una realización de la invención, como se describió anteriormente, el medio fluido en el cual se extrae el material activo y/o en el cual tiene lugar la bioconversión es simplemente agua. Sin embargo, en una realización preferible, el agua usada es agua estructurada, es decir agua I, agua S o una combinación de ambas, como se describe, por ejemplo, en los documentos RO 88053 [agua tipo S], RO 88054 (agua tipo I) y las patentes estadounidenses nº 5.846.397 y 6139855. El uso de agua estructurada en una o ambas de estas fases del proceso de bioconversión puede mejorar adicionalmente las propiedades buscadas del material activo y, en algunos casos, puede marcar la diferencia entre el éxito o el fracaso de la bioconversión. Como norma general, cuando la formación de clústeres en agua(s) estructurada(s) mejora las propiedades biológicas o modifica el comportamiento bioquímico de un material concreto en

ausencia de bioconversión, como se describe en los documentos 5.846.397 y 6.139.855, entonces la realización de la extracción y/o proceso de bioconversión en presencia de agua(s) estructurada(s) también puede mejorar los resultados. Como también se ha indicado anteriormente, el medio de bioconversión generalmente no contiene nutrientes suficientes para permitir el crecimiento y multiplicación del organismo bioconversor, de forma que la única fuente de sustrato para la actividad bioquímica del organismo es el material activo proporcionado. Sin embargo, en una realización alternativa, se puede realizar con éxito la bioconversión en presencia de un medio con nutrientes adecuado para el crecimiento del micro-organismo.

El material natural seleccionado para la bioconversión puede ser cualquier material natural que presente una actividad biológica o propiedad bioquímica que se desee mejorar. El material inicial a partir del cual se prepara el extracto puede ser un extracto relativamente crudo de cualquier planta, o parte de una planta, conocida por presentar cierto nivel de actividad biológica o propiedad, tanto si se conoce la identidad química del componente, o componentes, activo como si no. Son conocidas y están documentadas una amplia variedad de plantas que contienen materiales activos. Ejemplos de las mismas se pueden encontrar en las obras D'Amelio, F.S., Sr., *Botanicals, a Phytocosmetic Desk Reference*, CRC Press, 1999, y Bruneton, J., *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, Lavoisier Publishing, 1995. Algunos ejemplos específicos de tales plantas incluyen extracto de regaliz (*Glycyrrhiza*), como un agonista de receptores estrogénicos, un inhibidor de tirosinasa (blanqueamiento cutáneo) y un protector mitocondrial; ácido ferúlico o sus derivados, como un agente blanqueante; extracto de romero, como un inductor del p450, un inhibidor de la degranulación de mastocitos y un antioxidante; manzanilla (*Matricaria*) para blanqueamiento y, en combinación con extractos de espinacas, como potenciadores de la comunicación por uniones gap, inhibición de ciclooxigenasa e iNOS e inhibición de la degranulación de mastocitos; lavanda, para la inhibición de la liberación de histamina y, en combinación con romero, para inducción del P450, mejorando la actividad de la glutatión-S-transferasa e inhibición de degranulación de mastocitos; jengibre (*Zingiber*), por sus propiedades digestivas y anti-inflamatorias y, en combinación con extracto de rosa, para la modulación de los receptores estrogénicos; enebro y espinacas en combinación, para la inhibición de la síntesis de prostaglandinas; hojas de té blanco o verde, como antioxidantes, abedul blanco, como un inhibidor de proteasas e inductor de proteínas de choque térmico, extractos de pepitas de uva u otros extractos de uva, como antioxidantes; *Pterocarpus ulei*, como antioxidante, inhibidor de hialuronidasa y anti-inflamatorio; *Centella asiatica*, para la estimulación del colágeno; *Aniba purchyrminor*, como un antioxidante, un inhibidor del factor de activación plaquetario y como un agente anti-angiogénico; *Echinacea*, por sus propiedades cicatrizantes e inmuno-estimulantes; *Aloe vera*, por sus propiedades contra la irritación y la adhesión; hierba de San Juan (*Hypericum*), por sus propiedades anti-depresivas y astringentes; margosa (*Azadirachta*) como repelente de insectos; y *Mimosa pudica*, por sus propiedades inhibitorias de colagenasa. Estos son solo algunos ejemplos y otros serán inmediatamente obvios para los expertos en la materia.

El material de partida también puede ser material de origen animal, tal como quitina, queratina, cartílago, colágeno y similares. Alternativamente, el material de partida puede ser un compuesto básicamente puro de origen vegetal o animal o químicamente sintetizado conocido por presentar actividad biológica, por ejemplo, cualquier número de flavonoides, isoflavonoides o antocianinas con actividades biológicas conocidas; aminoácidos y derivados de los mismos, tal como N-acetil cisteína y N-acetil glutamina, aldosaaminas, término que incluye derivados de las mismas, tal como N-acetil glucosamina, xantinas, término que incluye derivados de las mismas, tal como cafeína, antioxidantes, tal como resveratrol, o ácido rosmarínico, compuestos anti inflamatorios, tal como glicirricina, ácido glicirretínico y compuestos relacionados; o esteroides y precursores esteroideos, tal como el DHEA o precursores naturales del mismo. También se sobreentenderá que muchos de estos compuestos presentan más de una actividad biológica; por ejemplo, el resveratrol es tanto un antioxidante como un agente blanqueante. Tal como se usa en el presente documento, el uso de la expresión "materiales naturales" pretende abarcar no solo materiales procedentes directamente de la naturaleza, sino también materiales que están presentes en fuentes naturales pero que pueden haber sido preparados por medios sintéticos o semi-sintéticos.

Los materiales descritos en el presente documento son principalmente materiales que presentan una actividad biológica que es útil para aplicación vía tópica para mejorar los efectos terapéuticos o beneficiosos de los materiales sobre la piel, pero los expertos en la materia se darán cuenta fácilmente de que, en tanto en cuanto la función mejorada sea aplicable a otros sistemas de órganos, los materiales mejorados se podrán usar también sistémicamente. También se sobreentenderá que este procedimiento también se puede aplicar fácilmente a un material presente en la naturaleza de cualquier tipo que presente una actividad biológica aplicable única o principalmente para uso sistémico. Ejemplos de materiales herbáceos o vegetales de otro tipo conocidos por tener efectos medicinales sistémicos se describen tanto en la obra de D'Amelio como en la de Bruneton, véase anteriormente. Ejemplos concretos de materiales que tienen propiedades bioquímicas interesantes son aceites con fragancia o esenciales, que pueden presentar tanto beneficios cosméticos como beneficios sistémicos, especialmente en el campo de la aromaterapia. Los perfumes y aceites esenciales se han usado durante miles de años no sólo por sus propiedades de enmascaramiento de olor sino también debido a sus reconocidos efectos en el plano psicológico así como en el organismo. Una referencia útil respecto a esta información se encuentra en la obra Groom, N.; *Perfume, the ultimate guide to the world's finest fragrances*, Running Press, Philadelphia-London, 1999, incorporada al presente documento como referencia. Ejemplos de aceites esenciales útiles, o materiales vegetales que son conocidos por producir tales beneficios, son aceite esencial de rosa (disminuye la tensión), romero (tonificante), lavanda (relajación), limón (anti-depresivo), flor de azahar (disminuye la ansiedad), amaro (anti-depresivo), albahaca (aumenta el nivel de alerta y la memoria), anís (carminativo), melisa (anti-depresivo), sándalo (mejora del estado de ánimo), menta (estimulante mental) o ylang-ylang (aumenta la sensualidad). Cada uno de estos materiales, si se someten a bioconversión, puede mejorar al tener estas propiedades individuales mejoradas.

Una observación especialmente útil es que el proceso de bioconversión puede lograr que un aceite esencial sea hidrosoluble, bien modificando su estructura química o bien complejando el mismo con los dominios hidrófobos de las macromoléculas hidrosolubles, que se exponen al extracto durante la etapa de pirólisis. El geraniol procedente de aceite de rosa y aceites esenciales procedentes de romero y lavanda se han transformado en hidrosolubles mediante bioconversión.

Esta posibilidad de transformar en hidrosolubles compuestos que generalmente son insolubles en agua tiene excelentes aplicaciones en el campo de la formulación, en el cual la solubilidad, o la falta de la misma, de un material aconsejable en un tipo concreto de vehículo es, a menudo, problemática. Obviamente esta observación no está, por tanto, limitada a aceites esenciales sino que abarca una gran variedad de compuestos usados en cosmética, tal como rellenos, espesantes, tensioactivos y principios activos que presentan poca solubilidad en agua o aceite.

El aumento en la actividad observado con el actual proceso de bioconversión es especialmente sorprendente y ha sido demostrado con una amplia variedad de diferentes materiales presentes en la naturaleza con una amplia gama de actividades biológicas, como se observará en los siguientes ejemplos. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, este inesperado hecho puede ser debido a la solubilización o mayor biodisponibilidad de las moléculas activas, la transformación enzimática de los principios activos, la interacción sinérgica de los principios activos con los componentes de las levaduras tales como vitaminas o nutrientes o oligoelementos, es decir, aquellos elementos que se encuentran en el organismo en concentraciones muy bajas, o a una combinación de todos estos procesos. Cualquiera que sea el motivo, el éxito del aumento de actividad de una gran variedad de materiales naturales tanto crudos como relativamente puros, con diferentes identidades químicas y actividades biológicas, inequívocamente muestra la amplia aplicabilidad de la técnica de bioconversión para mejorar la actividad biológica presente de forma natural. El beneficio radica en la producción de un material que es más activo que el original para concentraciones equivalentes o incluso menores, lo cual, a su vez, proporciona mayor disponibilidad de materiales naturales, que si no serían posiblemente escasos y/o caros, con significativos beneficios biológicos.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra el proceso general de bioconversión que se puede usar con diversos materiales naturales.

A. Preparación del inóculo:

Veinticuatro horas antes de comenzar el proceso de bioconversión se prepara un cultivo fresco de levadura *Saccharomyces cerevisiae*: ATCC 60219. Se inocula una colonia de una placa con estriado en fresco en un frasco con agitación de 400 ml que contiene el 100% de caldo tripona soja. Se prepara suficiente inóculo para que constituya el 1% (vol/vol) del volumen total de la bioconversión. Esto constituye una proporción levadura/medio aproximadamente del 0,01% al 0,1% en húmedo peso/volumen. Una vez que se ha determinado el volumen de la conversión, se elige un recipiente para alojar el proceso.

B. Preparación del extracto:

El material que se va a extraer para bioconversión (p. ej., material vegetal finamente dividido) se añade a 100 ml de agua o a una mezcla de agua:etanol 50:50, o a agua I con 0,01 ppm de iones de plata en los clústeres o a agua I, o a agua S u otros disolventes orgánicos como butilenglicol en una proporción p/p entre el 0,01 y el 10%. La mezcla vegetal-disolvente se incuba a temperatura ambiente durante un periodo de una semana. Tras la incubación, el residuo que queda se elimina mediante filtración y, en caso de extracciones hidroalcohólicas, se eliminan los alcoholes que quedan mediante evaporación rotatoria, quedando un extracto que se añadirá al recipiente de bioconversión.

C. Inóculo:

El recipiente contiene agua destilada estéril o agua I o agua S o mezclas de las mismas. A lo anterior se añade el extracto en proporciones que varían del 0,01% (al igual que, a menudo, en el caso de aceites esenciales con aroma) al 10% (volumen/volumen). Tras la adición del ingrediente activo o extracto vegetal el recipiente se puede inocular con *Saccharomyces cerevisiae*, que se había preparado previamente como se describió anteriormente. Toda bioconversión que use *S. cerevisiae* se inocula con el 1,0% (del volumen total) de la bioconversión. El agitador se ajusta a la velocidad deseada, típicamente 20-200 rpm, a una temperatura de aproximadamente 25°C, con oxigenación de 0,2-2 litros/min.

D. Tiempo de procesado:

La bioconversión durará 24-72 horas. Se toman muestras a intervalos de 24 horas para control del pH, recuento de placas, evaluación olfativa y visual y grabación en un registro de datos. También se tomarán 20 ml de muestra cada 24 horas para evaluación de la estabilidad. El punto final del proceso generalmente se determina monitorizando el pH, como un indicador de actividad biológica, hasta el momento en que se estabiliza, y entonces se detiene el proceso de conversión. En este momento la temperatura se eleva hasta 45°C durante un día y, a

continuación, se lleva a cabo una etapa pirolítica, en la cual la temperatura se eleva hasta 90-95°C durante 10-15 minutos.

Tras la pirolisis, el medio se filtra a través de filtros de tamaño de poro decreciente: 8, 2 y 0,22 micrómetros. Una vez filtrada, la muestra se conserva con 0,5% de fenoxietanol u otros conservantes o se almacena a 4 C° y se guarda para uso posterior.

Ejemplo 2

Se preparan productos de fermentación de diferentes materiales naturales básicamente como se describe en el ejemplo 1, o ese proceso modificado como se indica, y, a continuación, se ensayan para determinar su nivel de actividad. Los resultados observados son los siguientes:

A. *Centella asiatica*.

Se sabe que los extractos de *Centella asiatica* presentan actividad potenciadora del colágeno. Para intentar mejorar esta actividad, se incubó una muestra de extracto de *Centella asiatica* al 0,1% con levadura al 0,1% durante 96 horas. El ensayo se realiza como se indica a continuación: se sembraron células NHDF y se dejaron crecer hasta confluencia en una placa de 96 pocillos antes del tratamiento. Las muestras ensayadas fueron levadura seca (p/v) termolisada durante 10 minutos, levadura seca al 0,1% termolisada durante 96 horas, *Centella asiatica* al 0,1% (p/v) en dH₂O y *Centella asiatica* al 0,1% (p/v) que fue sometida al proceso de bioconversión descrito anteriormente durante 96 horas con levadura al 0,1% en dH₂O. Cada una de las muestras se filtro de forma estéril y diluyó adicionalmente en medio antes de ser ensayada. Las muestras se diluyeron al 10%, 5%, 2,5% y el 1,25%. Teniendo en cuenta que la concentración de partida de *Centella* era del 0,1% (p/v), las concentraciones finales de *Centella* ensaya fueron 0,00125%, 0,0025%, 0,005% y 0,01% (p/v). La placa se incubó durante 3 días a 37°C / 5% CO₂ antes de recoger el sobrenadante, y se almacenó a -80°C en tubos siliconados hasta que se realizó el ELISA. Se realizó el PIP ELISA (Pan-Vera Technology, Código MK101) tal como se detalla en el protocolo suministrado por el fabricante y los resultados se calcularon a partir de la curva patrón.

La muestra de *Centella asiatica* bioconvertida termolisada durante 96 horas presenta una actividad de estimulación de la síntesis *in-vitro* de colágeno que es de tres a cuatro veces mayor que la de la muestra no bioconvertida. La muestra de control de levadura termolisada durante 10 minutos en dH₂O no induce ningún cambio en la síntesis de colágeno en cultivos de fibroblastos humanos, ni tampoco la muestra de levadura que se termolisó 96 horas tras ser "rehidratada". Los resultados se muestran en el gráfico presentado como figura 1. Los resultados muestran claramente que la *Centella* bioconvertida proporciona un aumento en la síntesis de colágeno.

B. *Cafeína*

La cafeína en agua tiene considerables propiedades antioxidantes, siendo capaz de reducir la oxidación de lípidos mediante radiación ultravioleta. La cafeína se sometió a bioconversión en las concentraciones indicadas (p/v) en agua o en una mezcla de aguas estructuradas (I/S 60/40). Tras la bioconversión en agua estructurada, se observa una mayor capacidad de inhibir la peroxidación lipídica, como se indica posteriormente. La metodología para determinar la inhibición de la peroxidación lipídica se puede encontrar, por ejemplo, en el documento Pelle y col., Ann N. Y. Acad. Sci. 570 : 491-494 (1989).

Concentración de cafeína	Inhibición de peroxidación lipídica			
	No bioconvertida		Bio-convertida	
	H ₂ O	agua I/S	H ₂ O*	agua I/S
0,05%	30%	24%	39%*	55%
0,25%	54%	58%	53%*	78%
0,5%	66%	66%	68%*	87%

*los resultados de esta columna indican una bioconversión realizada en un medio que contiene nutrientes, como se describe en el ejemplo 3 posterior.

C. *Resveratrol*

El resveratrol es un conocido antioxidante, capaz de inhibir la peroxidación inducida por UV de lípidos en un ensayo liposómico como describen Pelle y col., véase anteriormente. Con la bioconversión en agua S, sus propiedades antioxidantes se potencian (véase tabla posterior).

Concentración de resveratrol en agua S	Actividad anti-oxidante	
	No bioconvertido	Bioconvertido
0%	0%	
0,05%	1,8%	0,47%
0,25%	8%	77%
0,5%	39%	92%

Los efectos positivos de la bioconversión sobre las propiedades anti-oxidantes del resveratrol no se obtienen cuando el proceso de bioconversión se realiza en agua destilada.

5 El resveratrol también es un conocido inhibidor de la tirosinasa, siendo la concentración que inhibe el 50% de la actividad enzimática (IC50) del 0,05%. La bioconversión en agua S aumenta aproximadamente un 20% la potencia inhibitoria del resveratrol: tras la bioconversión en agua S, el IC50 del resveratrol es del 0,041%.

D. Abedul blanco

10 Los extractos de abedul blanco contienen compuestos que son inhibidores relativamente débiles de la elastasa, posiblemente debido a su baja solubilidad en agua. En agua I/S (60/40), el IC50 del extracto de abedul blanco respecto a la elastasa es del orden del 7,5%. Tras la bioconversión en aguas I/S (60/40), su actividad anti-elastasa aumenta al menos diez veces, siendo el IC50 de los extractos de abedul blanco bioconvertidos del 0,7%.

E. Extracto de espinacas

15 (i) Cuando se priva de suero a un cultivo de fibroblastos durante 24 horas, la síntesis del ADN resulta negativamente afectada. Un extracto de espinacas al 0,01-0,1% estimula la síntesis de ADN en un cultivo de fibroblastos privados de suero menos del doble, en comparación con el control negativo "solo medio", mientras que el 1% y el 10% de suero fetal bovino restaura la síntesis de ADN, aumentando los valores de la línea de referencia tres veces y siete veces, respectivamente. Cuando el extracto de espinacas se bioconvierte, el extracto de espinacas al 0,01-0,1% aumenta la síntesis de ADN un factor de cinco-siete en células privadas de suero y parece, por tanto, que el extracto de espinacas se comporta como un micronutriente con una actividad de estimulación de síntesis de ADN comparable con la del 10% de suero.

20 (ii) Los fibroblastos privados de suero también muestran una morfología dañada, caracterizada por la presencia de numerosas vacuolas en el citoplasma; la morfología vuelve a ser normal mediante adición del 1% o 10% de suero. El extracto de espinacas sin tratar al 0,01-0,1% no es capaz de restaurar la morfología sana, pero las espinacas bioconvertidas en las mismas concentraciones son capaces de restaurar la morfología sana.

F. *Pterocarpus ulei* y *Aniba purchyriminor*

30 *P. ulei* es una planta ecuatorial conocida por sus propiedades anti-inflamatorias. *A. purchyriminor* es una planta ecuatorial que contiene inhibidores del PAF (factor de activación plaquetario). *A. purchyriminor* también está dotada de una agradable fragancia. Cada una de las plantas *Pterocarpus ulei* y *Aniba purchyriminor* presenta actividad antioxidante. La mezcla de extractos de las dos plantas, por tanto, constituye un perfume con actividades biológicas útiles. Se midieron sus propiedades anti-oxidantes y se observó que habían mejorado tras la bioconversión. Al 0,002%, los extractos de *Pterocarpus ulei* inhiben la peroxidación lipídica inducida por UV un 64%, pero al 0,0005% no presentan actividad; al 0,002%, la *Aniba purchyriminor* inhibe la peroxidación un 73%, pero al 0,0005% inhibe solo el 23%. Los extractos sin tratar, en una concentración del 1% cada uno, se combinan y diluyen al 0,1% cada uno y se someten a bioconversión. Los extractos convertidos exhiben un aumento de casi tres veces respecto a su actividad antioxidante, porque al 0,0001% inhiben el 12% de la peroxidación y al 0,0002% inhiben el 26%.

G. Aceites esenciales

40 Se transformó un aceite esencial de rosa, compuesta principalmente por geraniol, en hidrosoluble mediante bioconversión en una concentración del 0,05% y se ensayó en agua para estudiar su efecto sobre el estado de ánimo. El estado de ánimo se puede evaluar en sujetos usando el test psicológico estándar de Perfil de los Estados de Ánimo (POMS), que mide la tensión, depresión, enfado, vigor, fatiga y confusión. La modificación del estado de ánimo se puede determinar en sujetos que completan el cuestionario POMS antes y después de oler una fragancia concreta.

Se pidió a un grupo de 42 voluntarios que rellenara un cuestionario antes y diez minutos después de oler aceite esencial de rosa bioconvertida o no bioconvertida, puntuando su estado de ánimo en una escala de 1-11. El resultado

del experimento fue que el aceite esencial de rosa bioconvertida disminuye la tensión en mucho mayor grado que la rosa no bioconvertida, como se muestra en las tablas posteriores.

De forma similar, se bioconvirtió un aceite esencial de romero en una concentración del 1%. El aceite esencial de romero está ampliamente documentada en la literatura publicada para aumentar el vigor. Descubrimos que el romero bioconvertido disminuye el vigor, el enfado y la tensión.

5

TABLA 1

Material	Estado de ánimo	Antes	Después	n	P
Romero biocon	Tensión	3,44	1,07	45	0,006
	Enfado	3,24	1,78	45	0,05
	Vigor		Variación del histograma	45	
Lavanda biocon	Tensión	3,55	1,17	42	0,01
	Vigor		Variación del histograma	42	
Lavanda + romero biocon	Vigor		Variación del histograma*	42	
Rosa biocon	Tensión		Variación del histograma**	38	

* véanse detalles en (b) a continuación.

** véanse detalles en (a) a continuación.

(a)

Estado de ánimo	número de participantes en el estado de ánimo			
	Aceite esencial de rosa		Aceite esencial de rosa bioconvertida	
tensión	Antes de olerla	Después de olerla	Antes de olerla	Después de olerla
0	3	3	0	0
1	3	5	7	9
2	6	8	8	11
3	4	5	11	11
4	2	1	8	3
5	2	4	0	1
6	4	2	1	1
7	3	1	2	1
8	3	1	1	1
9	1	3	0	0

ES 2 375 357 T3

10	1	0	0	0
11	1	1	0	0

(b)

Estado de ánimo	número de participantes en el estado de ánimo	
	Lavanda + romero bioconvertidos	
vigor	Antes de olerlos	Después de olerlos
0	0	0
1	0	2
2	4	1
3	3	11
4	4	4
5	10	2
6	4	4
7	4	5
8	5	6
9	6	1
10	0	5
11	2	1

(c) un ejemplo de control negativo: agua

Estado de ánimo	número de participantes en el estado de ánimo	
	Agua	
depresión	Antes de olerla	Después de olerla
0	0	0
1	0	0
2	20	22
3	10	9
4	5	4

5	2	3
6	2	1
7	1	1
8	0	1
9	0	1
10	1	0
11	1	0

Tabla 2

Aceite esencial	Efectos tradicionales documentados sobre el estado de ánimo
Lavanda	Relajante, anti-nerviosismo, disminuye la melancolía, alivia la fatiga, anti-depresivo, estimulante
Romero	Estimulante cerebral, vigorizante, anti-depresivo
Rosa	Anti-estrés, calmante, anti-depresivo, potencia los sentimientos positivos

Ejemplo 3

5 El procedimiento descrito en el ejemplo 1 se puede modificar para incluir un medio con nutrientes en el cual pueda crecer la levadura. Un ejemplo de ingredientes adecuados para el medio son los siguientes:

Ingredientes del medio de fermentación
Extracto de levadura Biospringer 3g/L
Extracto de malta Briess 3g/L
Hidrolisado de guisantes Marcor 5g/L
Glucosa 10g/L

10 El proceso de conversión se realiza como se describió en el ejemplo anterior, con las modificaciones siguientes. El proceso durará 24-72 horas dependiendo de la tasa de utilización de carbohidratos. Cuando la conversión ha finalizado, el procesado final está hecho. No se realiza etapa de pirólisis. Todo el contenido del recipiente se somete a sonicación en vasos de precipitados de vidrio durante 1 hora. Se añaden perlas de vidrio al frasco para favorecer el proceso de sonicación. Tras sonicación, el medio se centrifuga en recipientes de 200 ml a 4000 rpm durante 15 minutos. Las muestras centrifugadas se pasan, a continuación, por un filtro de 0,22 um. Una vez filtrada, la muestra se conserva con 0,5% de fenoxietanol y se guarda para uso posterior.

Ejemplo 4

15 Se usa el procedimiento del ejemplo 3 para convertir N-acetil glucosamina y manosa-6-fosfato, cada uno de los cuales es conocido por presentar actividad biológica en la descamación de las células cutáneas. El efecto de los agentes exfoliantes bioconvertidos se ensaya entonces respecto a su capacidad de mejorar la exfoliación de la piel y se evalúa como se indica a continuación.

Diseño del estudio

5 Los sujetos incluidos en este estudio fueron 120 mujeres con edades entre 21 y 65 años, cumpliendo todos los criterios de cribado de buena salud y no estaban embarazadas ni en periodo de lactancia. Los sujetos indicados se presentaron para el ensayo sin hidratantes o cualquier otro producto en sus manos y se tomaron medidas de la línea de referencia. Se asignaron de forma aleatoria a uno de los siguientes ocho grupos de tratamiento. Se les proporcionó el producto para que se lo llevaran a casa y se lo administrasen ellos mismos solo en su mano derecha, dos veces al día, por la mañana después de lavarse y por la noche al menos 15 minutos antes de irse a dormir, durante cuatro semanas. La mano izquierda sirvió como la zona de control sin tratar. A los sujetos se les permitió usar solo el producto de ensayo y anotar específicamente su uso en una agenda diaria que se les proporcionó. Tras dos y cuatro semanas los sujetos volvieron para el ensayo sin haberse aplicado el producto durante al menos 12 horas y se volvieron a evaluar en las mismas condiciones.

Exfoliación de la piel mediante el procedimiento de discos D-Squame y análisis de imágenes

15 Con cuatro discos D-Squame se ejerció presión de forma firme y uniforme sobre la cara y el dorso de cada mano con un dispositivo de sujeción de la mano de presión uniforme y se retiraron suavemente apartándolos de la piel. Los discos D-Squame se montaron en portamuestras para microscopio transparentes y se etiquetaron con el nombre y visita del participante.

La descamación se evaluó a partir de los discos D-Squame mediante el analizador de imágenes. La evaluación de la piel se llevó a cabo antes del tratamiento y tras dos y cuatro semanas de tratamiento.

20 Se usó el analizador de imágenes OPTIMA para evaluar la escamación cutánea. Las muestras de D-Squame, que contienen corneocitos de la capa, se colocan bajo una cámara en la parte superior de una mesa con luz y cada imagen se importa al analizador de imágenes. Se midió el Valor de Grises medio correspondiente a la densidad de la muestra. Cuanto más densa es la muestra, mayor es la diferencia en el valor de Grises.

Productos de ensayo y asignación de grupos:

Se asignaron los siguientes grupos de ensayo:

- 25
1. Placebo (base D1)
 2. 1% caldo
 3. Caldo + levadura = 1% fermento
 4. 1% caldo + N-acetil glucosamina
 5. 1% caldo + manosa-6-fosfato

30

 6. 1% fermento de N-acetil glucosamina
 7. 1% fermento de manosa-6-fosfato
 8. 1 % fermento de manosa-6-fosfato + amaro + turmalina

Resultados

35 La exfoliación de la piel se evaluó midiendo la cantidad de escamas eliminadas de la superficie cutánea usando discos D-Squame y analizando los mismos mediante el procedimiento de AI. En este estudio se usan diversas combinaciones de fermentos de N-acetil D-glucosamina y manosa-6-fosfato frente al placebo, el caldo y el fermento como controles, respecto a su efecto en la descamación cutánea. Los datos demuestran claramente que el proceso de fermentación potenció la actividad de ambos materiales. La glucosamina mostró sistemáticamente una eficacia superior a la de la manosa-6-fosfato. Los resultados se resumen en la tabla 3 posterior.

40

Tabla 3

	% de disminución en la escamación		valor p	
	2 semanas	4 semanas	2 semanas	4 semanas
Placebo (base D1)	10,7	12,2	0,259	0,179
Caldo	14,0	13,7	0,046	0,010
Caldo + levadura = fermento	13,2	17,1	0,029	0,031
Caldo + N-acetil glucosamina	24,5	30,7	0,000	0,000
Caldo + manosa-6-fosfato	16,6	25,2	0,000	0,000
Fermento de N-acetil glucosamina	27,7	36,4	0,000	0,000
Fermento de manosa-6-fosfato	22,2	28,2	0,000	0,000
Fermento de manosa-6-fosfato + amaro + turmalina	19,8	24,8	0,000	0,001

Ejemplo 5

5 Se realizó otra serie de ensayos como se describió anteriormente. La concentración de N-acetil D-glucosamina y manosa-6-fosfato se redujo diez veces sin que su actividad se viese comprometida. La tabla 4 posterior resume las concentraciones activas reales usadas con una breve descripción junto con su actividad.

Tabla 4

Descripción	Concentración de principios activos en la fórmula	Disminución en la escamación	
		2 semanas	4 semanas
1. Placebo (base D1)	0	11%	12%
2. 1% de caldo (medio que contiene nutrientes para la levadura)	0	14%	14%
3. 1% de fermento (caldo + levadura fermentada 3-5 días)	0	13%	17%
4. 1% (caldo que contiene el 10% de N-acetil glucosamina)	0,1%	25%	31%
5. 1% (caldo que contiene el 10% de manosa-6-fosfato)	0,1%	17%	25%
6. 1% (fermento que contiene el 10% de N-acetil glucosamina)	0,1%	28%	36%
7. 1% (fermento que contiene el 10% de manosa-6-fosfato)	0,1%	22%	18%
8. 1% N-acetil glucosamina **	1,0%	16%	27%
9. 1% manosa-6-fosfato **	1,0%	22%	29%

** Nota: los n^{os} 8 y 9 se ensayaron previamente en una base y los resultados mostrados representan su actividad respecto al placebo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de fabricación de una preparación bioconvertida, que comprende las etapas de:
 - a. incubar un material de origen vegetal o animal no humano seleccionado para bioconversión en un entorno acuoso durante un periodo de tiempo suficiente para extraer material activo del material vegetal o animal no humano,
 - 5 b. someter el material de (a) a un proceso de bioconversión, en el cual el extracto se combina con microorganismos de levadura a temperatura ambiente, se agita a 20-200 rpm con burbujeo de aire a 0,02-2 litros/minuto durante un periodo de al menos aproximadamente 24 horas,
 - c. pirolizar aumentando la temperatura hasta 90-95°C durante un periodo de aproximadamente 5-10 minutos.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual la levadura es *saccharomyces*.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual el microorganismo se incuba con el extracto básicamente en ausencia de cualquier nutriente en el medio.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual el microorganismo básicamente no exhibe crecimiento durante la incubación.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual el extracto es un extracto vegetal crudo.
- 15 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual el extracto es un compuesto de origen vegetal básicamente puro.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual el extracto es un extracto de origen animal no humano crudo.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual el extracto procede del grupo constituido por regaliz, matricaria, lavanda, jengibre, rosa, enebro, espinacas, té verde, té blanco, abedul blanco, *pterocarpus*, centella, aniba, *echinacea*, *hypericum*, *margosa*, *mimosa*, *romero*, *albahaca*, uva y aloe.
- 20 9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual el extracto procede del grupo constituido por quitina, queratina, colágeno y cartílago.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual el extracto es un compuesto seleccionado del grupo constituido por flavonoides, isoflavonoides, antocianinas, aminoácidos, aldósaminas, xantinas, fosfosacáridos, resveratrol, ácido rosmarínico, glicirricina, esteroides y precursores esteroideos.
- 25 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual el extracto es un aceite esencial de plantas.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual el medio comprende al menos un agua estructurada.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual el extracto se ha preparado en presencia de al menos un agua estructurada.
- 30 14. Un material presente en la naturaleza bioconvertido preparado según el procedimiento de la reivindicación 1.
15. El material de la reivindicación 14, que procede de regaliz, matricaria, lavanda, jengibre, rosa, enebro, espinacas, té verde, té blanco, abedul blanco, *pterocarpus*, centella, aniba, *echinacea*, *hypericum*, *margosa*, *mimosa*, *romero*, *albahaca*, uva y aloe.
- 35 16. El material de la reivindicación 14, que procede de quitina, queratina, colágeno o cartílago.
17. El material de la reivindicación 14, que procede de un compuesto seleccionado del grupo constituido por un compuesto seleccionado del grupo constituido por flavonoides, isoflavonoides, antocianinas, aminoácidos, aldósaminas, xantinas, fosfosacáridos, resveratrol, ácido rosmarínico, glicirricina, esteroides y precursores esteroideos.
- 40 18. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual el medio se proporciona con nutrientes suficientes para el crecimiento del micro-organismo.
19. Un material bioconvertido preparado según el procedimiento de la reivindicación 18.
20. El material de la reivindicación 19, que procede de una aldósamina o un fosfosacárido.
- 45 21. Una composición cosmética o farmacéutica que contiene una cantidad biológicamente activa del material bioconvertido de la reivindicación 14.

22. Una composición cosmética o farmacéutica que contiene una cantidad biológicamente activa del material bioconvertido de la reivindicación 19.

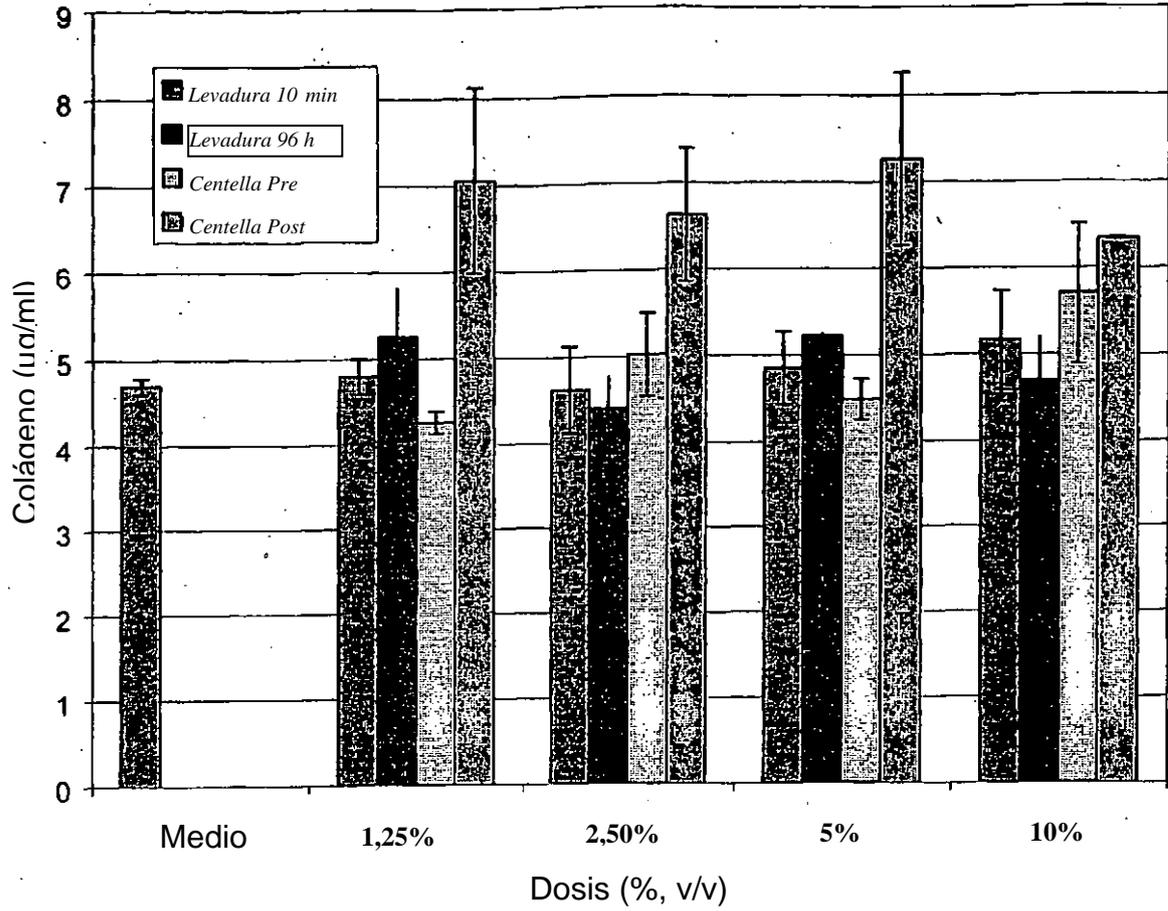


Figura 1