

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 465 949**

51 Int. Cl.:

A61K 36/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2005 E 05711431 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 1722805**

54 Título: **Composiciones bioactivas de plantas de Theacea y procedimientos para su producción y uso**

30 Prioridad:

12.01.2004 US 535861 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.06.2014

73 Titular/es:

**AKZO NOBEL SURFACE CHEMISTRY LLC
(100.0%)
525 West Van Buren Street
Chicago, IL 60607-3835, US**

72 Inventor/es:

KOGANOV, MICHAEL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 465 949 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

Composiciones bioactivas de plantas de Theacea y procedimientos para su producción y uso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones bioactivas, procedimientos para su producción a partir de plantas de Theacea, y usos de estas composiciones.

Antecedentes de la invención

10 La familia *Theacea* (plantas de té) incluye árboles o arbustos que comprenden aproximadamente 40 géneros y 600 especies. La *Camellia sinensis* ocupa una posición única en la familia *Theacea*, debido a que esta especie particular de planta se usa predominantemente como fuente de materia prima única para producir los tres tipos básicos de té: té verde, té oolong y té negro (denominados en conjunto en el presente documento "planta de té"). De acuerdo con algunas fuentes, existe un cuarto tipo de té, es decir, el denominado "té blanco", que se produce exclusivamente a partir de los brotes o puntas de la planta de té.

15 Las tres formas básicas de té están determinadas por el grado de procesamiento, que implica las hojas de té jóvenes tiernas idénticas. Las hojas se arrancan, se clasifican, se limpian y se oxidan de forma diversa antes de la vaporización o del secado. El término "fermentación" se usa con frecuencia para describir el procesamiento del té, pero el término "oxidación" es una descripción mucho más adecuada de las transformaciones químicas que tienen lugar.

20 Aunque existen algunas variaciones en el procesamiento, en general se acepta que el té verde tiene el menor grado de oxidación y que el té negro tiene el mayor. Se considera que el té oolong está parcialmente oxidado, y por tanto ocupa el lugar entre el té verde y el té negro. Con respecto al procesamiento, existe muy poca diferencia (o ninguna diferencia) entre el té verde y el té blanco.

25 El té verde se prepara a partir de hojas frescas que se vaporizan y se marchitan y, a continuación, se secan de inmediato. El té negro se prepara a partir de hojas que se marchitan y se machacan con rodillos, a continuación se deja que se oxiden durante varias horas antes de que se sequen. El té oolong viene de las hojas que se oxidan parcialmente antes del secado.

30 En todo el mundo, el té es el segundo (después del agua) líquido consumido más comúnmente, y es el sexto (después del agua, refrescos, café, cerveza y leche) líquido usado más comúnmente en los Estados Unidos. El consumo de té continúa su incremento en todo el mundo, en especial debido a la creciente sensibilización pública sobre los beneficios en la salud de este líquido. Existe un número creciente de publicaciones que sugieren propiedades anti-angiogénicas, anti-bacterianas, anti-cancerígenas, anti-inflamatorias, anti-mutagénicas, antioxidantes, anti-sépticas y desintoxicantes de los tés y sus ingredientes. La lista de beneficios del té también incluye una reducción en el riesgo de artritis reumatoide, disminución en los niveles de colesterol y propiedades anti-diabéticas. No se ha demostrado que todos estos beneficios sean estadísticamente significativos. No obstante, el espectro tan amplio de los beneficios del té refleja la composición única de las sustancias biológicamente activas tan potentes, que existen en las hojas de plantas recién cosechadas y que sobreviven al procesamiento convencional del té.

35 En particular, se ha informado de que las hojas frescas *Camellia sinensis* contienen un 22,2 % de polifenoles, un 17,2 % de proteína, un 4,3 % de cafeína, un 27,0 % de fibra cruda, un 0,5 % de almidón, un 3,5 % azúcares reductores, un 6,5 % pectinas, un 2,0 % extracto de éter y un 5,6 % de ceniza (Duke, J.A., Handbook of Energy Crops (1983), véase www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Camellia_sinensis.html). Por 100 g, se informa de que la hoja contiene 8,0 g de H₂O, 24,5 g de proteína, 2,8 g de grasa, 58,8 g de carbohidratos totales, 8,6 g de fibra, 5,9 g de ceniza, 327 mg de Ca, 313 mg de P, 24,3 mg de Fe, 50 mg de Na, 2700 µg equivalente de β-caroteno, 0,07 mg de tiamina, 0,8 mg de riboflavina, 7,6 mg de niacina y 9 mg de ácido ascórbico. Otro informe coincide 8,0 g de H₂O, 28,3 g de proteína, 4,8 g de grasa, 53,6 g de carbohidratos totales, 9,6 g de fibra, 5,6 g de ceniza, 245 mg de Ca, 415 mg de P, 18,9 mg de Fe, 60 mg de Na, 8400 µg equivalente de β-caroteno, 0,38 mg de tiamina, 1,24 mg de riboflavina, 4,6 mg de niacina y 230 mg de ácido ascórbico. Otro también da 8,1 g de H₂O, 24,1 g de proteína, 3,5 g de grasa, 59,0 g de carbohidratos totales, 9,7 g de fibra, 5,3 g de ceniza, 320 mg de Ca, 185 mg de P, 31,6 mg de Fe, 8400 µg equivalente de β-caroteno, 0,07 mg de tiamina, 0,79 mg de riboflavina, 7,3 mg de niacina y 85 mg de ácido ascórbico (J. A. Duke y A. A. Atchley, "Proximate Analysis", en: Christie, B.R. (ed.), The Handbook of Plant Science in Agriculture, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1984)).

40 Las hojas también contienen caroteno, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico ácido y ácido ascórbico. La cafeína y el tanino están entre los constituyentes más activos (Council for Scientific and Industrial Research, 1948-1976). El ácido ascórbico, presente en la hoja fresca, se destruye en la preparación del té negro. Se producen ácidos málico y oxálico, junto con kaempferol, quercitrina, teofilina, teobromina, xantina, hipoxantina, adenina, gomas, dextrinas e inositol. Los componentes principales del aceite volátil (0,007 - 0,014 % del peso fresco de las hojas) son hexenal, hexenol, y aldehídos inferiores, butiraldehído, isobuteraldehído, isovaleraldehído, así como

alcoholes n-hexílico, bencílico y feniletílico, fenoles, cresol, ácido hexoico, alcohol n-octílico, geraniol, linalol, acetofenona, alcohol bencílico y citral.

Se ha encontrado que la hoja de té fresco tiene un nivel inusualmente alto del grupo flavanol de polifenoles (catequinas), que puede alcanzar hasta un 30 % de la materia seca de la hoja. Las catequinas incluye predominantemente (-)-epicatequina, galato de (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina y galato de (-)-epigallocatequina. Adicionalmente, son únicos para el té el ácido 3-galoilquínico (teogalina) y único el aminoácido teanina (5-N-etilglutamina) (Duke, J.A., Handbook of Energy Crops (1983), véase www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Camellia_sinensis.html).

Las hojas de té contienen niveles altos de polifenol-oxidasa y peroxidasa. La primera enzima cataliza la oxidación aerobia de las catequinas y este procedimiento se inicia cuando se altera la integridad de la estructura celular de la hoja. La fenol-oxidasa es responsable de la generación de bisflavonoles, teaflavinas, ácidos epiteaflávicos y tearubigenos, que constituyen la mayor masa de materia extraíble en el té negro. La mayoría de estos compuestos formar fácilmente complejos con cafeína, que tiene un nivel significativo (2 - 4 % de la materia seca) en las hojas frescas. La peroxidasa desempeña un papel importante en la generación de los complejos anteriores con las proantocianidinas. Las catequina quinonas también inician la formación de muchos de los cientos de compuestos volátiles descubiertos en la fracción aromática del té negro. Adicionalmente, tiene lugar la transformación de glucósidos relativamente solubles en agluconas de menor solubilidad.

Todas las cascadas de complejos de los procesos anteriores se inician por la alteración de la estructura celular de la hoja y se intensifican con el tiempo de oxidación. Como resultado, la composición del té negro, que normalmente se procesa con laminación o corte intenso y un tiempo de oxidación relativamente largo, es mucho más diferente de la hoja fresca. Aunque el té verde (y el té blanco) se procesa con una oxidación mínima, y su composición es más similar a la de las hojas frescas, existen cambios catalizados enzimática y no enzimáticamente, que se producen de forma extremadamente rápida después del arrancado, y se producen nuevas sustancias volátiles durante la etapa de secado. Por tanto, incluso un procesamiento del té verde relativamente suave inicia cierta desviación en la composición original de la planta fresca y puede disminuir el valor terapéutico y otros beneficios potenciales de las hojas de la planta de té frescas.

Numerosos estudios recientes demuestran claramente que los beneficios terapéuticos del son decrecientes en la siguiente secuencia: té blanco > té verde > té oolong > té negro. Por tanto, la exploración de las plantas de té frescas puede prevenir la degradación de actividades específicas, que se observan como resultado del procesamiento convencional de té. Las hojas de *Camellia* tiernas, frescas, contienen aproximadamente un 80 % de agua. El hinchamiento y la deshidratación de las células se previenen por las paredes celulares rígidas de las células. La alteración de la estructura de la pared celular desencadena la deshidratación del tejido de la planta fresca seguido de la secuencia de procesos fisicoquímicos y bioquímicos no deseados: choque osmótico, descompartmentalización y alteración de enzimas, hidrólisis y oxidación, polimerización de fenoles, transformación de glucósidos a agluconas, generación de productos de la reacción de Maillard, isomerización y contaminación microbiana. Por lo tanto, la *Camellia* fresca contiene un espectro muy amplio de sustancias biológicamente activas y sólo parte de ellas están disponibles durante los procedimientos de extracción convencionales. Por tanto, sólo las paredes celulares, catabolitos y metabolitos estables se pueden extraer con agua hirviendo para obtener una bebida de té o para su extracción con diferentes disolventes para obtener partes limitadas de componentes biológicamente activos (predominantemente polifenoles y flavonoides).

En vista del potencial de las hojas de té frescas como fuente de composiciones bioactivas terapéuticas valiosas y otras potencialmente beneficiosas, es necesaria la exploración de plantas de té frescas para determinar cómo maximizar sus propiedades bioactivas terapéuticas y otras potencialmente beneficiosas.

Gensler et al (Nutrition and Cancer, vol. 26, n.º 3, 1996 páginas 325-335) divulga la prevención de la fotocarcinogénesis por administración tópica de galato de epigallocatequina puro aislado de té verde.

Zhao et al (Photochemistry and Photobiology, 1999, 70(4) p. 637-644) describe el efecto fotoprotector de extractos de té negro frente a la fototoxicidad inducida por UVB en la piel.

Vayalil et al (Carcinogenesis, vol. 24, n.º 5, p. 927-936, 2003) divulga que el tratamiento de polifenoles del té verde en crema hidrófila previene la oxidación inducida por UVB de lípidos y proteínas, reducción de enzimas antioxidantes y fosforilación de proteínas MAPK en la piel de ratones sin pelo SKH-1.

Sumario de la invención

La materia objeto de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención es útil para abordar las deficiencias de los procedimientos de procesamiento de té convencionales, en particular la incapacidad del procesamiento de té convencional para preservar un espectro amplio de composiciones bioactivas potentes. Como se proporciona por la presente invención, el procesamiento de biomasa de *Camellia* fresca sin fermentación y tratamiento térmico excesivo puede proporcionar composiciones bioactivas más potentes y diversificadas que los productos de procesamiento de té convencional.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un dibujo esquemático que demuestra un modo de realización del procedimiento para preparar las composiciones bioactivas de la presente invención.

5 La figura 2 es un gráfico que muestra los espectros UV/VIS de extractos de una fracción de paredes celulares y téis convencionales (dilución 1: 1000).

La figura 3 es un gráfico que muestra los espectros UV/VIS de composiciones bioactivas de *Camellia* (dilución 1:4000).

10 La figura 4 es un gráfico que muestra los espectros de absorbancia de extractos de fracción de paredes celulares y téis convencionales aplicados en sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT). Los niveles de materia seca están igualados.

La figura 5 es un gráfico que muestra los espectros de absorbancia de composiciones bioactivas de *Camellia* aplicadas en sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT). Los niveles de materia seca están igualados.

15 La figura 6 es un gráfico que muestra los espectros de absorbancia de composiciones bioactivas de *Camellia* y extracto de té blanco aplicados en sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT).

La figura 7A es un gráfico que muestra los espectros de absorbancia de extracto de fracción de membrana de *Camellia* en solución diluida (1: 200) y aplicado en sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT). La figura 7B es un gráfico que muestra los espectros de absorbancia de suero de jugo celular de *Camellia* solución diluida (1:200) y aplicado en sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT).

20 La figura 8A es un gráfico que muestra los espectros de absorbancia de suero de jugo celular de cebada (*Hordeum vulgare*) en solución diluida (1:200) y aplicado a sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT). La figura 8B es un gráfico que muestra los espectros de absorbancia de suero de jugo celular de salvia (*Salvia officinalis*) en solución diluida solución (1:200) y aplicado en sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT).

25 La figura 9 es un gráfico que muestra el efecto de irradiación UV de amplio espectro en sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT).

La figura 10 es un gráfico que muestra el efecto de irradiación UV de amplio espectro en extracto de té blanco aplicado en sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT).

30 La figura 11 es un gráfico que muestra el efecto de irradiación UV de amplio espectro en extracto de fracción de paredes celulares aplicado en sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT).

La figura 12 es un gráfico que muestra el efecto de radiación UV de amplio espectro en extracto de fracción de membrana de *Camellia* aplicado en sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT).

La figura 13 es un gráfico que muestra el efecto de radiación UV de amplio espectro en suero de jugo celular de *Camellia* aplicado en sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT).

35 La figura 14 es un gráfico que muestra el efecto del extracto de té blanco en células MDA-MB-435S cultivadas durante 24 horas y 48 horas.

La figura 15 es un gráfico que muestra el efecto del extracto de té blanco en células MCF-7 cultivadas durante 24 horas (control) y durante 24 horas y 48 horas en presencia de 5 ng/ml de TGF-β.

40 La figura 16 es un gráfico que muestra el efecto del extracto de la fracción de paredes celulares en células MDA-MB-435S cultivadas durante 24 horas y 48 horas.

La figura 17 es un gráfico que muestra el efecto del extracto de la fracción de paredes celulares en células MCF-7 cultivadas durante 24 horas (control) y durante 24 horas y 48 horas en presencia de 5 ng/ml de TGF-β.

La figura 18 es un gráfico que muestra el efecto del extracto de la fracción de membrana en células MDA-MB-435S cultivadas durante 24 horas y 48 horas.

45 La figura 19 es un gráfico que muestra el efecto del extracto de la fracción de membrana en células MCF-7 cultivadas durante 24 horas (control) y durante 24 horas y 48 horas en presencia de 5 ng/ml de TGF-β.

La figura 20 es un gráfico que muestra el efecto del suero de jugo celular en células MDA-MB-435S cultivadas durante 24 horas y 48 horas.

La figura 21 es un gráfico que muestra el efecto del suero de jugo celular en células MCF-7 cultivadas durante 24 horas (control) y durante 24 horas y 48 horas en presencia de 5 ng/ml de TGF-β.

La figura 22 es un gráfico que muestra el efecto del extracto de té blanco en células Mono Mac 6 cultivadas durante 24 y 48 horas.

5 La figura 23 es un gráfico que muestra el efecto del extracto de té blanco en células Mono Mac 6 cultivadas durante 24 horas y 48 horas en presencia de PMA 10 nM.

La figura 24 es un gráfico que muestra el efecto de extracto de la fracción de paredes celulares en células Mono Mac 6 cultivadas durante 24 horas y 48 horas.

10 La figura 25 es un gráfico que muestra el efecto de extracto de la fracción de paredes celulares en células Mono Mac 6 cultivadas durante 24 horas y 48 horas en presencia de PMA 10 nM.

La figura 26 es un gráfico que muestra el efecto del extracto de la fracción de membrana en células Mono Mac 6 cultivadas durante 24 horas y 48 horas.

La figura 27 es un gráfico que muestra el efecto del extracto de la fracción de membrana en células Mono Mac 6 cultivadas durante 24 horas y 48 horas en presencia de PMA 10 nM.

15 La figura 28 es un gráfico que muestra el efecto del suero de jugo celular en células Mono Mac 6 cultivadas durante 24 horas y 48 horas.

La figura 29 es un gráfico que muestra el efecto del suero de jugo celular en células Mono Mac 6 cultivadas durante 24 horas y 48 horas en presencia de PMA 10 nM.

20 La figura 30 es un gráfico que muestra el efecto del extracto de té blanco sobre el nivel de MPM secretadas por células Mono Mac 6 estimuladas con PMA.

La figura 31 es un gráfico que muestra el efecto del extracto de la fracción de paredes celulares en el nivel de MPM secretadas por células Mono Mac 6 estimuladas con PMA.

La figura 32 es un gráfico que muestra el efecto del extracto de la fracción de membrana sobre el nivel de MPM secretadas por células Mono Mac 6 estimuladas con PMA.

25 La figura 33 es un gráfico que muestra el efecto del suero de jugo celular sobre el nivel de MPM secretadas por células Mono Mac 6 estimuladas con PMA.

La figura 34 es un zimograma de gelatina de medio cultivado recogido después de 48 horas de exposición de células Mono Mac 6 a extracto de té blanco, junto con medio de cultivo recogido de células cultivadas en ausencia (U) o en presencia (S) de PMA 10 nM, pero en ausencia de las composiciones de *Camellia*.

30 La figura 35 es un zimograma de gelatina de medio cultivado recogido después de 48 horas de exposición de células Mono Mac 6 a extracto de fracción de paredes celulares, junto con medio de cultivo recogido de células cultivadas en ausencia (U) o en presencia (S) de PMA 10 nM, pero en ausencia de las composiciones de *Camellia*.

35 La figura 36 es un zimograma de gelatina de medio cultivado recogido después de 48 horas de exposición de células Mono Mac 6 a extracto de fracción de membrana, junto con medio de cultivo recogido de células cultivadas en ausencia (U) o en presencia (S) de PMA 10 nM, pero en ausencia de las composiciones de *Camellia*.

La figura 37 es un zimograma de gelatina de medio cultivado recogido después de 48 horas de exposición de células Mono Mac 6 a suero de jugo celular, junto con medio de cultivo recogido de células cultivadas en ausencia (U) o en presencia (S) de PMA 10 nM, pero en ausencia de las composiciones de *Camellia*.

40 La figura 38 es un gráfico de barras que compara el contenido de varias catequinas en el extracto de té blanco ("WTE") y en el extracto de la fracción de paredes celulares ("CWFE"), el extracto de la fracción de membrana ("MFE"), y el suero de jugo celular ("CJS") de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se refiere al uso de una composición bioactiva. La composición bioactiva es o incluye una fracción bioactiva aislada derivada de una planta de *Camellia*. Como se usa en el presente documento, el término "fracción bioactiva aislada" quiere decir que incluye fracciones que están aisladas de biomasa fresca de una planta de *Camellia* que no ha sufrido ningún procesamiento de té convencional (por ejemplo, tratamiento térmico, oxidación, fermentación, secado). Las fracciones bioactivas aisladas adecuadas son una fracción de paredes celulares, un extracto de la fracción de paredes celulares, una fracción de membrana, un extracto de la fracción de membrana, un suero de jugo celular, y/o combinaciones de los mismos.

Las fracciones bioactivas de la presente invención pueden tener varios perfiles y cantidades de contenido en catequina total, como se define a continuación, y como se determina usando procedimientos de diagnóstico de catequina convencionales bien conocidos en la técnica. Como se usa en el presente documento, el término "catequina" se refiere en general a todas las catequinas, incluyendo pero sin limitarse a, los siguientes tipos específicos de catequinas: (i) (-)-epigallocatequina (véase n.º CAS 970-74-1, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad); (ii) (+)-catequina (véase n.º CAS 7295-85-4, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad); (iii) (-)-epicatequina (véase n.º CAS 490-46-0, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad); (iv) galato de (-)-epigallocatequina (véase n.º CAS 989-51-5, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad); (v) galato de (-)-galocatequina (véase n.º CAS 4233-96-9, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad); y (vi) galato de (-)-epicatequina (véase n.º CAS 1257-08-5.). "Contenido en catequina total" (como se usa en el presente documento) se refiere al nivel de contenido combinado de todas las catequinas contenidas en una fracción bioactiva particular de la presente invención, y no quiere decir que esté limitado a los niveles de contenido sólo de los tipos específicos de catequinas enumeradas anteriormente en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "perfil de contenido en catequina" se usa para describir las cantidades de capturas seleccionadas contenidas en una fracción bioactiva particular de la presente invención.

En un modo de realización de la composición bioactiva de la presente invención, la fracción bioactiva puede ser una fracción de paredes celulares.

En un modo de realización de la composición bioactiva de la presente invención, la fracción bioactiva puede ser un extracto de la fracción de paredes celulares. En un modo de realización específico de la presente invención, el extracto de la fracción de paredes celulares puede tener un contenido en catequina total de entre aproximadamente 2,1 y aproximadamente 4,5 miligramos por gramo de materia seca, en particular, de entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 4,0 miligramos por gramo de materia seca, y más en particular, de entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 3,6 miligramos por gramo de materia seca. En otro modo de realización específico, el extracto de la fracción de paredes celulares puede tener un perfil de contenido en catequina como sigue: (i) entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 3,0 miligramos de (+)-catequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de paredes celulares; (ii) entre aproximadamente 0,005 y aproximadamente 0,02 miligramos de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de paredes celulares; (iii) entre aproximadamente 0,005 y aproximadamente 0,02 miligramos de galato de (-)-epigallocatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de paredes celulares; y (iv) entre aproximadamente 0,003 y aproximadamente 0,01 miligramos de galato de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de paredes celulares. Más en particular, el extracto de la fracción de paredes celulares puede tener un perfil de contenido en catequina como sigue: (i) entre aproximadamente 2,2 y aproximadamente 2,7 miligramos de (+)-catequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de paredes celulares; (ii) entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,015 miligramos de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de paredes celulares; (iii) entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,015 miligramos de galato de (-)-epigallocatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de paredes celulares; y (iv) entre aproximadamente 0,005 y aproximadamente 0,007 miligramos de galato de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de paredes celulares.

En un modo de realización de la composición bioactiva de la presente invención, la fracción bioactiva puede ser una fracción de membrana.

En un modo de realización de la composición bioactiva de la presente invención, la fracción bioactiva puede ser un extracto de la fracción de membrana. En un modo de realización específico de la presente invención, el extracto de la fracción de membrana puede tener un contenido en catequina total de entre aproximadamente 15,0 y aproximadamente 30,5 miligramos por gramo de materia seca, en particular, de entre aproximadamente 18,0 y aproximadamente 27,5 miligramos por gramo de materia seca, y más en particular, de entre aproximadamente 21,0 y aproximadamente 24,5 miligramos por gramo de materia seca. En otro modo de realización específico, el extracto de la fracción de membrana puede tener un perfil de contenido en catequina como sigue: (i) entre aproximadamente 1,7 y aproximadamente 3,3 miligramos de (-)-epigallocatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana; (ii) entre aproximadamente 6,1 y aproximadamente 10,2 miligramos de (+)-catequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana; (iii) entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 1,1 miligramos de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana; (iv) entre aproximadamente 6,2 y aproximadamente 12,5 miligramos de galato de (-)-epigallocatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana; (v) entre aproximadamente 0,007 y aproximadamente 0,03 miligramos de galato de (-)-galocatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana; y (vi) entre aproximadamente 1,3 y aproximadamente 3,3 miligramos de galato de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana. Más en particular, el extracto de la fracción de membrana puede tener un perfil de contenido en catequina como sigue: (i) entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 3,0 miligramos de (-)-epigallocatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana; (ii) entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 9,0 miligramos de (+)-catequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana; (iii) entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 0,9 miligramos de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de

membrana; (iv) entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 10,0 miligramos de galato de (-)-epigalocatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana; (v) entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,02 miligramos de galato de (-)-galocatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana; y (vi) entre aproximadamente 1,8 y aproximadamente 2,8 miligramos de galato de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana.

En un modo de realización de la composición bioactiva de la presente invención, la fracción bioactiva puede ser un suero de jugo celular. En un modo de realización específico, el suero de jugo celular puede tener un contenido en catequina total de entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 20,0 miligramos por gramo de materia seca, en particular, de entre aproximadamente 10,0 y aproximadamente 18,0 miligramos por gramo de materia seca, y más en particular, de entre aproximadamente 12,0 y aproximadamente 16,0 miligramos por gramo de materia seca. En otro modo de realización específico, el suero de jugo celular puede tener un perfil de contenido en catequina como sigue: (i) entre aproximadamente 2,1 y aproximadamente 4,4 miligramos de (-)-epigalocatequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular; (ii) entre aproximadamente 4,2 y aproximadamente 8,6 miligramos de (+)-catequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular; (iii) entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 2,0 miligramos de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular; (iv) entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 3,2 miligramos de galato de (-)-epigalocatequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular; (v) entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,1 miligramos de galato de (-)-galocatequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular; y (vi) entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 1,3 miligramos de galato de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular. Más en particular, el suero de jugo celular puede tener un perfil de contenido en catequina como sigue: (i) entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 3,5 miligramos de (-)-epigalocatequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular; (ii) entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,0 miligramos de (+)-catequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular; (iii) entre aproximadamente 0,7 y aproximadamente 1,5 miligramos de (-)-catequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular; (iv) entre aproximadamente 1,7 y aproximadamente 2,7 miligramos de galato de (-)-epigalocatequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular; (v) entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 0,07 miligramos de galato de (-)-galocatequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular; y (vi) entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1,0 miligramos de galato de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular.

Se usa biomasa fresca de plantas de *Theaceae* para aislar las composiciones bioactivas de la presente invención. La biomasa fresca se toma de plantas de *Theaceae* que son del género *Camellia*. Las especies adecuadas del género *Camellia* para su uso en la presente invención pueden incluir, sin limitación, *Camellia sinensis*, *Camellia japonica*, *Camellia reticulata* y *Camellia sasanqua*.

La composición bioactiva de la presente invención puede incluir además agentes estabilizantes. Los agentes estabilizantes adecuados son los usados comúnmente en la técnica. Los agentes estabilizantes adecuados particulares pueden incluir, sin limitación, un emulsionante, un conservante, un antioxidante, una matriz polimérica y/o mezclas de los mismos.

En otro modo de realización, la composición bioactiva de la presente invención puede incluir además un sistema de administración para la administración tópica que se usa comúnmente en la técnica.

La presente invención también se refiere a una formulación tópica bioactiva adecuada para la aplicación tópica a un mamífero. En un modo de realización, la formulación tópica bioactiva incluye una cantidad tópicamente eficaz de la composición bioactiva de la presente invención. La formulación tópica bioactiva puede incluir además un vehículo tópicamente aceptable. Los vehículos tópicamente aceptables adecuados pueden incluir, sin limitación, una base de crema hidrófila, una base de loción hidrófila, una base de tensioactivo hidrófilo, una base de gel hidrófila, una base de solución hidrófila, una base de crema hidrófoba, una base de loción hidrófoba, una base de tensioactivo hidrófobo, una base de gel hidrófobo y/o una base de solución hidrófoba. En un modo de realización, la composición bioactiva puede estar presente en una cantidad que varía de entre aproximadamente un 0,001 por ciento y aproximadamente un 90 por ciento del peso total de la formulación tópica bioactiva.

A modo de ejemplo, el procedimiento global para preparar las fracciones bioactivas de la presente invención (como se describe anteriormente en el presente documento) se muestra esquemáticamente en la figura 1. Los detalles de las etapas de procesamiento se describen además en los ejemplos (*infra*). Como se representa en la figura 1, la biomasa fresca **10** (por ejemplo, biomasa de planta fresca) de plantas de *Camellia* se somete a molienda, maceración y prensado **20** en condiciones eficaces para destruir las paredes celulares rígidas, y de este modo proporcionar el jugo celular de planta **30** y las paredes celulares **32**. La biomasa fresca **10** también se usa para el procesamiento de té convencional **22** para producir un control positivo **150** para el muestreo y la evaluación comparativos. El jugo celular **30** se somete a coagulación **40** usando un tratamiento de microondas para lograr la coagulación cuantitativa de los componentes de la fracción de membrana de la biomasa de planta fresca **10**. La coagulación **40** es suficiente para permitir la separación posterior de la fracción de membrana coagulada de otros componentes no coagulados del jugo celular **30**. Como se muestra en la figura 1, un modo de realización de dicha separación se logra por enfriamiento y centrifugación **42** para proporcionar la fracción de membrana (precipitado) **50** y el sobrenadante **60**, que está libre de componentes de la membrana de cloroplastos específicos tales como clorofila y fosfolípidos.

Para producir el extracto de la fracción de paredes celulares (es decir, la composición **A 110**), las paredes celulares **32** se someten a secado **34** (por ejemplo, varios tratamientos con microondas posteriores) y a continuación a mezclado del material seco con agua **36** en condiciones usadas comúnmente para preparar té convencionales (por ejemplo, mezclado en agua a 85 °C).

- 5 Para producir el extracto de la fracción de membrana (es decir, la composición **B 120**), la fracción de membrana **50** se somete a mezclado con disolvente **52** y a continuación centrifugación **54** para proporcionar el sobrenadante **56** y la composición **B 120**.

- 10 Para producir el suero de jugo celular (es decir, la composición **D 140**), el sobrenadante **60** se somete a coagulación **62** (por ejemplo, precipitación isoelectrónica) y a centrifugación **64** para proporcionar el suero de jugo celular (sobrenadante) **66** y a continuación la composición **D 140**. El procesamiento de té convencional **22** de biomasa fresca **10** se usa para producir, por ejemplo, el control positivo **150** (de varios té, incluyendo, por ejemplo, los té blanco, verde, oolong y negro).

La composición **A 110**, composición **B 120**, composición **D 140**, y el control positivo **150** se pueden usar a continuación para la nitración y las pruebas **80**.

15 Ejemplos

Ejemplo 1- Preparación de composiciones bioactivas derivadas de plantas *Camellia sinensis*

En la figura 1 se muestra un esquema de un modo de realización del procedimiento de preparación de las composiciones bioactivas de la presente invención. A continuación se muestra una descripción de aspectos relevantes de un modo de realización del procedimiento de la presente invención.

- 20 *Preparación de biomasa.* Se cultivaron cantidades suficientes de biomasa de planta *Camellia* (*Camellia sinensis*) fresca (sólo tejido superior de planta joven tierna con brotes) para proporcionar aproximadamente 100 kg de materia seca. Se calculó que el nivel de materia seca en la biomasa fresca era de un 21,70 %, requiriendo el cultivo de aproximadamente 461 kg de biomasa de planta fresca para proporcionar 100 kg de materia seca. Se tuvo cuidado de preservar el contenido en humedad inherente de la biomasa de planta y de evitar el marchitamiento debido a la pérdida de humedad. Se llevó a cabo el cultivo de manera tal que se evitara o se minimizara el picado, la maceración y la formación de posos de la biomasa recogida para evitar la alteración de la estructura celular de la hoja, lo que desencadena las reacciones enzimáticas endógenas catalizadas por fenoloxidasas y peroxidasas. Debido a que estas reacciones se intensifican con el tiempo de oxidación, se completaron todas las etapas en el periodo de tiempo más corto posible. Por ejemplo, se administró biomasa cultivada para el procesamiento no más de 10 minutos después del corte. Esto se realizó para minimizar la exposición de la biomasa de planta al sol, temperatura alta y otros factores ambientales negativos. Se realizó una etapa de lavado para retirar las partículas de suelo y otros restos de las plantas antes del procesamiento adicional. Este lavado se llevó a cabo lavando las plantas cultivadas durante ≤ 5 minutos en ≤ 1 kg/cm² de presión de agua. El lavado con agua residual no contenía ningún pigmento verde ni marrón, lo que indica una presión de agua y una duración del lavado apropiadas. Se retiró el agua en exceso de la biomasa de planta lavada.

- 35 *Molienda, maceración y prensado de la biomasa de planta.* Después del cultivo, recogida y lavado de la biomasa de planta, las plantas sufren a continuación molienda, maceración y prensado pressing para extraer el contenido intracelular (es decir, el jugo celular de planta) y para separarlo de la fracción de las paredes celulares enriquecida de fibra (fracción de paredes celulares). Se usó un molino de martillos (modelo VS 35, Vincent Corporation, FL) que tiene un motor de 10 HP y conjunto de pantallas, para moler la biomasa para proporcionar partículas de tejido de planta de un tamaño adecuadamente pequeño en la menor cantidad de tiempo y sin un incremento significativo de la temperatura de la biomasa. Se ajustó el molino de martillos para producir el tamaño máximo de partículas de planta macerada de $\leq 0,5$ centímetros durante ≤ 10 segundos de tratamiento. La temperatura de la biomasa se incrementó sólo ≤ 5 °C. Se usó de inmediato una prensa de husillo continua horizontal (Compact Press "CP-6", Vincent Corporation, FL) para extraer el jugo celular de planta de la planta. Se mantuvo la presión en el cono de la prensa de husillo en un nivel de 24 kg/cm², con una velocidad de husillo de 12 rpm y un incremento de temperatura de sólo ≤ 5 °C. Este tratamiento proporcionó los 185 kg de fracción de paredes celulares que tiene un nivel de materia seca de un 41,39 % y 276 kg de jugo celular de planta que tiene un nivel de materia seca de un 8,49 %.

- 40 *Preparación del extracto de la fracción de paredes celulares (composición A).* Se secó la alícuota de la fracción de paredes celulares que tiene un nivel de materia seca inicial de un 41,39 % en una combinación de campana de microondas (modelo GH9115XE, Whirlpool) durante 30 s y a continuación se enfrió durante 30 s. Se repitió este tratamiento varias veces hasta que el nivel de materia seca en la fracción de paredes celulares alcanzó un 96,52 %. Se añadieron los 66,01 de agua desionizada con una temperatura de 85 °C a 4,0 kg de fracción seca de paredes celulares y se mantuvo con agitación alta durante 5 min. Estas condiciones están de acuerdo con el procedimiento de preparación de té, que se describe en D'Amelio, F.S., *Botanicals. A Phytocosmetic Desk Reference*, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press, p. 361 (1999), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad (véanse también los análisis en www.leaftea.com; www.divinitea.com; www.equatorcoffee.com, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad). Se filtró la

mezcla a través de 4 capas de una tela de nailon y a continuación a través del filtro que tiene poros de 0,8 μm . El pH del extracto de paredes celulares obtenido era igual a 5,24 y el nivel de materia seca era igual a un 0,84 %. Este extracto se usó además para las pruebas de sus actividades. *Separación de la fracción de membrana a partir del jugo celular.* El jugo celular de planta inicial que tiene un nivel de materia seca de un 8,49 % contenía partículas de fibra pequeñas, que se retiraron por filtración a través de cuatro capas de tela de nailon o usando biomasa de centrifugación a baja velocidad. El jugo celular de planta filtrado se expuso a tratamiento de microondas usando un control de sonda de temperatura. Este tratamiento continuó hasta que la temperatura del jugo celular alcanzó 60 °C. Se indujo la coagulación, el jugo celular tratado se enfrió de inmediato hasta 40 °C. Se logró la separación de la fracción de membrana del jugo celular coagulado usando centrifugación mayor de o igual a 3.000 g durante más de o igual a 20 minutos. Esto proporcionó una fracción de membrana (precipitado) y un sobrenadante de jugo celular, que contenía una fracción de citoplasma fracción y una fracción de suero celular (es decir, componentes solubles de bajo peso molecular). Se usó la fracción de membrana que tiene un nivel de materia seca de un 32,89 % en la preparación del extracto de composición bioactiva derivada de membrana. Se usó el sobrenadante de jugo celular para el procesamiento adicional para proporcionar fracción de citoplasma y suero de jugo celular.

Preparación del extracto de la fracción de membrana (composición B). Se mezclaron una parte de fracción de membrana (10,0 kg) y dos partes de dimetilsulfóxido - (20,0 kg) a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación permanente. A continuación, se centrifugó el material a más de o igual a 4.000 g durante más de o igual a 45 minutos. Se desechó el precipitado y se filtró el sobrenadante a través del filtro que tiene poros de 0,8 μm . Se usó este filtrado que tiene un nivel de materia seca de un 6,83 % - extracto de la fracción de membrana (composición B) para pruebas adicionales de sus actividades.

Separación de la fracción de citoplasma del sobrenadante de jugo celular. Para separar la fracción de citoplasma, el sobrenadante de jugo celular se sometió a precipitación isoelectrónica. Se indujo la precipitación de la fracción de citoplasma usando un procedimiento de valoración utilizando ácido clorhídrico (HCl) 5,0 N para llevar el pH del jugo celular sobrenadante hasta 4,0. Se logró la separación de la fracción de citoplasma precipitada que tiene un nivel de materia seca de un 14,5 % del sobrenadante por centrifugación a más de o igual a 3.000 g durante más de o igual a 20 minutos.

Preparación del extracto de fracción de citoplasma (composición C). Se mezclaron una parte de fracción de citoplasma (10,0 kg) y dos partes de dimetilsulfóxido - (20,0 kg) a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación permanente. A continuación, se centrifugó el material a más de o igual a 4.000 g durante más de o igual a 45 minutos. Se desechó el precipitado y se filtró el sobrenadante a través del filtro que tiene poros de 0,8 μm . Se puede usar este filtrado que tiene un nivel de materia seca de un 3,50 % - extracto de fracción de citoplasma (composición C) para pruebas adicionales de sus actividades.

Preparación del suero de jugo celular (composición D). Después de la separación de la fracción de citoplasma, el sobrenadante contenía partículas suspendidas. Para separar estas partículas, se centrifugó el sobrenadante a más de o igual a 7.500 g durante más de o igual a 30 minutos. Se filtró el sobrenadante transparente - suero de jugo celular a través del filtro que tiene poros de 0,8 μm . Se usó este filtrado (composición D) que tiene un nivel de materia seca de un 5,69 % para pruebas adicionales de sus actividades.

Preparación de extractos de tés convencionales - Controles. Se usó el mismo lote de hojas de *Camellia* frescas, que se usó para la preparación de las composiciones A, B, C y D, para producir té blanco y té negro convencionales.

Se usó el siguiente procedimiento para producir té blanco. Se dispuso la biomasa fresca que contenía un 21,70 % de materia seca durante 20 s en agua hirviendo para inactivar las enzimas endógenas - fenoloxidas y peroxidas. Durante este procedimiento, se mantuvieron las hojas en la bolsa de criba de nailon. A continuación, se secaron las hojas tratadas en microondas durante 30 s y después se enfriaron durante 30 s. Se repitió este tratamiento varias veces hasta que el nivel de materia seca en la biomasa alcanzó un 93,74 %. A continuación, se añadieron 66,01 de agua desionizada con una temperatura de 85 °C a 4,0 kg de hojas secas y se mantuvo con alta agitación durante 5 min. Estas condiciones están de acuerdo con el procedimiento de preparación de té, que se describe en D'Amelio, F.S., *Botanicals. A Phytocosmetic Desk Reference*, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press, p. 361 (1999), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad (véase también los análisis en www.leaftea.com; www.divinitea.com; y www.equatorcoffee.com, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad). Se filtró la mezcla a través de 4 capas de una tela de nailon y se filtró a través del filtro que tiene poros de 0,8 μm . El pH del extracto de la fracción de paredes celulares obtenido era igual a 5,52 y el nivel de materia seca era igual a un 1,10 %. Este extracto se usó además para las pruebas de sus actividades.

Se usó el siguiente procedimiento para producir té negro. Se mantuvo la biomasa fresca que contenía un 21,70 % de materia seca a 25 °C con aireación periódica (1 hora "encendida" y 1 hora "apagada") hasta que el nivel de materia seca alcanzó un 35 %. A continuación, se molieron (machacaron) a las partículas que tienen un tamaño de 2-3 mm. Este procedimiento da lugar a un incremento en la temperatura de la biomasa hasta aproximadamente 30 °C. Se dispuso la biomasa molida en forma de capa (2" (5,08 cm) de alto) en una cinta transportadora de plástico para su fermentación (oxidación) durante 90 min a 25 °C. Se secó la biomasa fermentada, que adquirió el color marrón, a 130 °C durante 30 min hasta alcanzar un nivel de materia seca de un 97,5 %. A continuación, se añadieron 66,01 de agua desionizada con una temperatura de 85 °C a 4,0 kg de hojas secas y se mantuvo con alta

agitación durante 5 min. Estas condiciones están de acuerdo con el procedimiento de preparación de té, que se describe en D'Amelio, F.S., Botanicals. A Phytocosmetic Desk Reference, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press, p. 361 (1999), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad (véanse los análisis en www.leaftea.com; www.divinitea.com; www.equatorcoffee.com, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad). Se filtró la mezcla a través de 4 capas de una tela de nailon y se filtró a través del filtro que tiene poros de 0,8 µm. El pH del extracto de la fracción de paredes celulares obtenido era igual a 4,96 y el nivel de materia seca era igual a un 1,38 %. Este extracto se usó además para las pruebas de sus actividades.

Ejemplo 2- Distribución de materia seca con respecto a la preparación de composiciones bioactivas a partir de *Camellia sinensis*, *Camellia japonica*, *Camellia reticulate*, *Camellia sasanqua* y *Eurya sandwicensis*

Se analizaron y se compararon varias fracciones recogidas durante la producción de composiciones bioactivas para determinar su distribución de materia seca. La tabla 1 muestra la distribución de 100 kg de materia seca entre los productos de fraccionamiento de plantas de té. Se determinó que el procedimiento de la presente invención permite una conversión del rendimiento extraído en jugos celulares de planta en el intervalo de desde aproximadamente un 20 a un 30 % de materia seca de biomasa inicial. El rendimiento de materia seca de las fracciones de membrana estaba en el intervalo de un 5 % a un 10 % de materia seca de biomasa inicial y de un 25 % a un 35 % de materia seca de jugo celular. La tabla 1 muestra que los rendimientos de la materia seca de las fracciones de citoplasma no excedieron de un 1,0 % de la materia seca de biomasa inicial y posteriormente de un 2,5 % de la materia seca del sobrenadante de jugo celular. La mayoría de la materia seca del sobrenadante de jugo celular se concentró en suero de jugo celular. Se usaron la fracción de paredes celulares, la fracción de membrana y la fracción de citoplasma como fuentes para la preparación de sus extractos, que se categorizan como composiciones bioactivas. El suero de jugo celular se usó directamente "como es" como composición bioactiva posterior que no tiene disolventes exógenos.

Tabla 1 - Distribución de 100 kg de materia seca entre los productos del fraccionamiento de la biomasa fresca

Producto	Fuente de planta
	<i>Camellia sinensis</i>
Biomasa inicial	100,0
Fracción de paredes celulares	76,6
Jugo celular	23,4
Fracción de membrana	6,5
Fracción de citoplasma	0,6
Suero de jugo celular	16,3

Cabe destacar que los tres materiales seleccionados son la representación más diversificada de todas las estructuras funcionales, que existen en el tejido de la planta fresca. Sólo el suero de jugo celular soluble tiene propiedades fisicoquímicas, lo que permite la administración directa a los sistemas de prueba *in vitro* usados comúnmente. Se usaron la fracción de paredes celulares, la fracción de membrana y la fracción de citoplasma como materias primas para la extracción con disolventes. Debido a que la fracción de paredes celulares es estructuralmente similar a los productos de planta de té convencionales, se extrajo esta fracción con agua para proporcionar la mejor comparación con té convencionales. Se extrajo la fracción de membrana con dimetilsulfóxido, que facilita la solubilización eficaz de los componentes tanto hidrófobos como hidrófilos integrados en las estructuras de cloroplastos y mitocondrias. Se extrajo la fracción de citoplasma con agua. Se usó el suero de jugo celular "como es".

La tabla 2 muestra el rendimiento de las cuatro composiciones bioactivas probadas: extracto de la fracción de paredes celulares (composición A), extracto de la fracción de membranas (composición B), extracto de la fracción de citoplasma (composición C), suero de jugo celular (composición D) y controles - extracto de té blanco o extracto de té negro de 100 kg de la biomasa materia seca inicial.

Tabla 2 - Rendimiento de las composiciones bioactivas de 100 kg de biomasa inicial

Producto	Fuente de planta
	<i>Camellia sinensis</i>
Biomasa inicial	100,0
Composición A (extracto de la fracción de paredes celulares)	14,35

Composición B (extracto de la fracción de membrana)	2,37
Composición C (extracto de la fracción de citoplasma)	0,2
Composición D (suero de jugo celular)	16,3
Control (extracto de té blanco o té negro)	15,14...19,36

La tabla 2 muestra que el rendimiento total de las composiciones bioactivas A, B, C y D de 100 kg de materia seca de *Camellia sinensis* iguala un 33,3 %, lo que excede significativamente el rendimiento del procedimiento de té convencional - 15,14...19,36 %.

5 Ejemplo 3- Comparación de la composición A (extracto de la fracción de paredes celulares) y extractos de té convencionales

Se midieron varios parámetros de la composición bioactiva A y extractos de té blanco y té negro obtenidos a partir del mismo lote de *Camellia sinensis* fresca y los resultados posteriores de estos se presentan en la tabla 3 (Los procedimientos experimentales usados se describen en los ejemplos 9 y 10, y en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. N.º 2003/0175235).

10 Tabla 3 - Varios parámetros de la composición bioactiva A y extractos de té blanco y negro.

Parámetro	Extracto de la fracción de paredes celulares (composición A)	Controles	
		Extracto de té blanco	Extracto de té negro
Materia seca, %	0,84	1,10	1,38
pH	5,24	5,52	4,96
Conductividad, mS/cm	1,57	2,23	5,32
Sólidos disueltos totales, g/l	0,78	1,23	2,71
Potencial redox, mV	123	159	188
Área bajo la curva de los espectros (ASC) 200 - 450 nm, Abs • nm	5,727	6,604	4,616
ASC : Materia seca	6,818	6,004	3,345
Actividad eliminadora de superóxido (RCI ₅₀), µg DM/ml	26,3	114,5	227,1
Color (escala 1...10)	9,6	4,7	7,5
Sabor (escala 1...10)	9,3	6,1	6,6
Sensación bucal (escala 1...10)	9,4	6,5	5,3

La tabla 3 muestra que el extracto de la fracción de paredes celulares tienen menores niveles de materia seca, electrolitos y sólidos disueltos en comparación con los extractos de té blanco y té negro convencionales. Los datos espectrales UV/VIS muestran que el extracto de la fracción de paredes celulares tiene el valor específico más alto del área bajo la curva de los espectros, es decir este producto particular de *Camellia* (composición A) tiene el mayor nivel de constituyentes ópticamente activos por unidad de materia seca. Adicionalmente, el extracto de la fracción de paredes celulares tiene la menor cantidad de potencial redox, lo que indica que esta composición se oxida menos que los extractos de té blanco y té negro convencionales. El extracto de la fracción de paredes celulares demostró la actividad eliminadora de superóxido, dando como resultado una inhibición del 50 % de la reducción de la c de citocromos (RCI₅₀) a una concentración mucho menor que los extractos de té blanco y té negro. Se seleccionó un procedimiento de prueba de análisis de descripción cualitativo ("QDA") para caracterizar y cuantificar sistemáticamente té basándose en el color, sabor y sensación bucal, que rigen la aceptabilidad de las bebidas de té. El procedimiento de QDA emplea un equipo entrenado de catadores expertos para cuantificar los atributos anteriores de las bebidas de té con relación a los estándares de referencia definidos. La evaluación comparativa del color, sabor y sensación bucal de los té demostró que el extracto de la fracción de las paredes celulares excedía significativamente las mismas características de los té convencionales.

Por tanto, la fracción de paredes celulares, que se obtuvo a partir de biomasa de *Camellia* fresca sin ninguna fermentación (oxidación) ni tratamiento térmico, es distinta de todos los demás té (Wilson et al., eds., Tea: Cultivation to Consumption, London: Chapman Hall (1992), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). Adicionalmente, las enzimas clave de *Camellia* (fenoloxidasas y peroxidasas) siempre permanecen dentro de los té convencionales. En cambio, la presente invención incluye la separación de hojas de

5 *Camellia* frescas en fracción de paredes celulares y jugo celular, que se enriquece por estas enzimas y por tanto la fracción de paredes celulares no contiene fenoloxidasa y peroxidasa endógena. Por lo tanto, la fracción de paredes celulares se debe categorizar como una nueva categoría de té que tiene diferencias fundamentales en comparación con los tés blanco, verde, oolong y negro. Este té con fracción de paredes celulares novedoso se puede usar suelto o en forma de bolsa u otras manifestaciones para preparar un amplio espectro de bebidas, y aditivos para productos alimenticios nutracéuticos y funcionales.

Ejemplo 4 - Preparación de composiciones bioactivas para diferentes aplicaciones

10 Se pueden usar todas las composiciones bioactivas como soluciones, suspensiones, dispersiones, pastas o polvos secos incorporadas en una variedad de formulaciones para administraciones tópicas o sistémicas. Las formas solubilizadas de las composiciones se pueden filtrar a través de filtros que tienen poros de 0,2 µm para retirar completamente partículas pequeñas no completamente solubilizadas y microorganismos endógenos. El nivel de materia seca en las composiciones bioactivas antes y después de la filtración esterilizada se presenta en la tabla 4.

Tabla 4 - Nivel de materia seca en las composiciones bioactivas antes (numerador) y después (denominador) de la filtración esterilizada

Producto	Fuente de planta
	<i>Camellia sinensis</i>
Composición A (Extracto de fracción de paredes celulares)	0,84
	0,72
Composición B (Extracto de membrana fracción)	6,83
	6,12
Composición D (Suero de jugo celular)	5,69
	5,59
Control (Extracto de té blanco)	1,10
	1,03

15 La tabla 4 muestra que los niveles de materia seca en todas las composiciones bioactivas disminuyeron después de la filtración esterilizante. Sin embargo, esta disminución no dio lugar a ninguna pérdida o reducción significativa de sus actividades biológicas y estuvo en el intervalo del 2 - 14 %. Por lo tanto, la mayor parte de las composiciones está presentada por ingredientes bioactivos solubles.

20 Las hojas de *Camellia* frescas contienen ingredientes de peso molecular relativamente bajo (reducidos, no oxidados). Como resultado de los procedimientos de oxidación y polimerización en la fabricación de tés convencionales, los ingredientes potentes anteriores se transforman en las partes de las sustancias de peso molecular alto que tienen una actividad relativamente baja.

25 Las composiciones bioactivas de la presente invención se obtienen sin fermentación (oxidación) y tratamiento térmico excesivo. Esto, en cambio, evita las pérdidas irreversibles de las actividades de la planta fresca, que se pueden liberar con una potencia máxima usando, por ejemplo, sistemas de liberación de bolsa de té o análogo novedosos. En lugar de las bolsas de té de papel convencionales, que permiten que los ingredientes de té solubles se muevan a través de poros grandes al agua circundante, la bolsa de té novedosa se fabrica a partir de una membrana semipermeable. Esta bolsa contiene la composición bioactiva dentro y sólo permite que penetren a la fase acuosa circundante los ingredientes que tienen un peso molecular por debajo de cierto límite de membrana (por ejemplo, 5.000 Dalton). Los ingredientes que tienen mayor peso molecular permanecen dentro de la bolsa y por tanto, no se incluyen en la bebida.

35 Por lo tanto, el límite de los ingredientes que tienen un peso molecular por encima de un determinado nivel permite la producción de una bebida que no tiene ingredientes oxidados debido a que todos los ingredientes oxidados de las composiciones bioactivas que tienen un peso molecular por encima de un determinado nivel permanecen dentro de la bolsa. El diseño de bolsa de té novedosa se puede basar en una construcción de bolsa de té piramidal, que utiliza un tubo de membrana de diálisis. El diseño de la bolsa de té novedosa también puede incluir un marco de plástico fino que tiene la composición bioactiva dentro y dos superficies transparentes construidas a partir de la membrana semi-permeable. La selección de un valor límite de membrana particular se determina por el tipo de composición bioactiva, pero en general es preferente un límite mayor que permita la liberación en la fase acuosa circundante de un mayor porcentaje de materia seca de la composición que disminuya la cantidad del potencial redox.

Ejemplo 5 - Preparación de ingrediente tópico SF derivado de suero de jugo celular

El suero de jugo celular (composición D) no se puede usar como ingrediente activo de productos tópicos debido a su falta de estabilidad y deterioro de color y olor. El procedimiento descrito permite el refinamiento de la fracción de

5 suero de jugo celular para proporcionar un ingrediente tópico SF estable y activo (este procedimiento es similar al describe previamente en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. N.º 2003/0175235, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). El refinamiento del suero de jugo celular implicó las siguientes etapas: tratamiento térmico, enfriamiento, filtración y estabilización. El refinamiento se realizó de inmediato después de la separación del suero de jugo celular de la fracción de citoplasma como se describe en el ejemplo 1. Se expuso el suero de jugo celular a un tratamiento de microondas usando un control de sonda de temperatura. Este tratamiento continuó hasta que la temperatura del suero de jugo celular alcanzó 99 °C (se requería 90 °C como se describió previamente en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. N.º 2003/0175235, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). Una vez que se indujo la coagulación, el suero de jugo celular tratado se enfrió de inmediato hasta 10 °C. El suero de jugo celular coagulado se filtró a vacío a través de un filtro con poros de 0,8 µm (se usaron capas dobles de filtros Whatman N.º 2 en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2003/0175235). Se desechó el precipitado y se usó el suero de jugo celular resultante para procesamiento adicional (es decir, estabilización). Se logró la estabilización del filtrado de suero de jugo celular añadiendo conservantes (no se necesitó antioxidante exógeno como se describió previamente en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. N.º 2003/0175235.) y se logró incubar la mezcla hasta su completa solubilización. Los conservantes usados incluyeron lo siguiente: sorbato de potasio al 0,1 %, benzoato de sodio al 0,1 %, metilparabeno de sodio al 0,1 % y ácido cítrico al 0,1 %. Esta preparación dio como resultado la producción de 16,3 kg de rendimiento de materia seca (o aproximadamente 286 litros) de los ingredientes tópicos SF, que se usaron para la caracterización de sus cualidades bioactivas y fisicoquímicas. Las condiciones de almacenamiento recomendadas para el ingrediente tópico SF incluyen el almacenamiento en un recipiente cerrado protegido de la luz a una temperatura de entre 15 °C y 25 °C.

Ejemplo 6 - Especificaciones de producto del ingrediente tópico SF derivado de la fracción de suero de jugo celular

25 Se preparó el ingrediente tópico SF de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en el ejemplo 5. Se realizaron análisis del ingrediente tópico SF para determinar sus diversas características fisicoquímicas, microbianas, de citotoxicidad y bioactividad, como se describe a continuación. El ingrediente tópico SF es un líquido transparente, que tiene un color marrón amarillento claro y un olor característico suave. No se añadió disolvente (es decir glicol, aceite o agua) al medio de vehículo. La tabla 5 resume los datos físicos y químicos del ingrediente tópico SF.

30 Tabla 5 - Parámetros físicos y químicos del ingrediente tópico SF

Parámetro	Procedimiento	Resultados
Contenido en sólidos, %	Véase el ejemplo 10, "Procedimiento 1"	5,04
Gravedad específica, g/cm ³	USP <841>	1,015
Color	Escala Gardner	5 - 6
Índice de refracción	USP <831>	1.312
PH	USP <79I>	4,0
Potencial redox, mV	Véase referencia [1]	75
conductividad, S/m	Véase referencia [2]	1,02
Referencias: [1] Handbook of chemistry and Physics, 80ª edición, CRC Press, 1999-2000, 5-90; [2] Handbook of Chemistry and Physics, 80ª edición, CRC Press, 1999-2000, 8-21, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.		

La tabla 6 describe los datos de espectros UV con relación al ingrediente tópico SF.

Tabla 6 - Espectros UV del ingrediente tópico SF (dilución 1:500)

Pico	Parámetro	Procedimiento	Resultados
N.º 1	Inicio, mn	USP <197>	450
	Cima, nm	"-	266,5
	Final, nm	"-	247
	Altura, Abs	"-	0,231
	Área, Abs x nm	"-	13,676

N.º 2	Inicio, nm	USP <197>	247
	Cima, nm	"-"	204
	Final, nm	"-"	200
	Altura, Abs	"-"	1,396
	Área, Abs x mn	"-"	32,413

El análisis microbiano realizado de acuerdo con el siguiente procedimiento (USP <61>) demostró que el ingrediente tópico SF contiene menos de 100 unidades formadoras de colonias por gramo de muestra y no tiene patógenos (*E. coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas sp.* y *Staphylococcus aureus*). Estos datos demuestran que el ingrediente tópico SF satisface los requisitos industriales para los ingredientes de productos tópicos.

- 5 Se determinó que el ingrediente tópico SF era estable (es decir, mantenía la integridad física y química) durante al menos 12-18 meses mientras se almacene a una temperatura de entre 15 y 25 °C en un recipiente cerrado protegido de la luz. El ingrediente tópico SF es un producto biodegradable. En una evaluación clínica controlada, el ingrediente tópico demostró las actividades biológicas, que se resumen en la tabla 7.

Tabla 7 - Actividades biológicas del ingrediente tópico SF

Actividad	Procedimiento	µg DM/ml
Actividad eliminadora de superóxido (RCI ₅₀)	Véase el ejemplo 20, "Procedimiento 7"	69,5
Inhibidor de elastasa (CI ₅₀)	Véase el ejemplo 20, "Procedimiento 5"	32,3
Inhibidor de MPM-9 (CI ₅₀)	Véase el ejemplo 20, "Procedimiento 6"	14,6
Inhibidor de tripsina (CI ₅₀)	Véase referencia [1]	7,8
Referencia: [1] Cannel et al., <i>Planta Medica</i> 54:10-14 (1988), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.		

- 10 La tabla 7 mostró que el ingrediente tópico SF demostró capacidad eliminadora de superóxido. En una evaluación clínica controlada, el ingrediente tópico SF demostró una inhibición del 50 % de reducción de citocromo c (RCI₅₀) a una concentración de 69,5 µg de materia seca por ml. La RCI₅₀ de positivo control (ácido rosmarínico) = 26,5 µg/ml. Además de las propiedades antioxidantes, el ingrediente tópico SF demostró actividades antiproteolíticas frente a péptido hidrolasas, por ejemplo elastasa, gelatinasa B o la denominada matriz metaloproteínasa 9 (MPM-9), y
- 15 tripsina. Entre estas enzimas, la posición única pertenece a elastasa y MPM-9, que actúan de forma sinérgica y desempeñan un papel importante en la inflamación cutánea. Cabe destacar, que ambas MPM-9 y elastasa se secretan por los leucocitos (neutrófilos) y estas enzimas son las enzimas clave en la ruta final que da lugar a la inflamación. En general, se acuerda que si la preparación puede inhibir ambas enzimas (elastasa y MPM-9), se considera que dicha preparación es muy eficaz para tratar procedimientos inflamatorios.
- 20 Cabe destacar que los procedimientos de envejecimiento cutáneo, quemaduras solares, formación de heridas y cicatrices tienen el mismo mecanismo de inflamación, lo que implica tanto MPM-9 como elastasa. Por tanto, el ingrediente tópico SF que puede inhibir las dos enzimas anteriores tiene un espectro muy amplio de aplicaciones "entre las que está la lesión inflamatoria debido a los siguientes motivos:
- 25 a. Estas dos enzimas pueden sinergizar para degradar todos los componentes de la matriz extracelular de tejido humano;
- b. La elastasa puede inactivar la propia defensa inhibitoria del cuerpo frente a MPM-9; y
- c. La MPM-9 puede inactivar la propia defensa inhibitoria del cuerpo frente a la elastasa.

30 La combinación de las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes del ingrediente tópico SF sugiere que esta preparación hidrófila basada en la composición bioactiva D puede actuar sistémicamente en problemas de trastornos cutáneos muy fundamentales.

Ejemplo 7 - Preparación del ingrediente tópico MF derivado de la fracción de membrana

35 La fracción de membrana recién obtenida es una pasta que tiene color intenso y olor específico. Esta fracción se representa predominantemente por cloroplastos y su composición incluye predominantemente fosfolípidos, proteínas de membrana, clorofila y carotenoides. El secado de la fracción de membrana da como resultado pérdidas irreversibles de muchas propiedades valiosas requeridas para la exploración de la fracción de membrana como ingrediente tópico. Sin secar, la fracción de membrana inestable se transforma rápidamente en conglomerados insolubles y no dispersables de color oscuro que tienen un olor fuerte y no característico. Como resultado, dicho

material no se puede usar como ingrediente tópico. El procedimiento descrito a continuación permite la transformación de fracciones de membrana recién obtenidas en ingredientes tópicos estables y activos (este procedimiento es similar al descrito previamente en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. N.º 2003/0175235).

5 Inmediatamente después de la separación de la fracción de membrana del jugo celular de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en el ejemplo 1, la fracción de membrana se estabilizó y se incorporó en una matriz polimérica. Para preparar aproximadamente 100 gramos de ingrediente tópico MF, la fracción de membrana celular se estabilizó mezclándola con emulsionante no iónico polisorbato 80 (Tween 80) y antioxidantes (Tenox 4).
 10 Específicamente, se mezclaron enérgicamente 20 gramos de fracción de membrana fresca con 3,5 gramos de Tween 80 y 0,1 gramos de Tenox 4 (solución de hidroxianisol butilado e hidroxitolueno butilado en aceite) hasta homogeneidad, mientras se evita la aireación durante el mezclado.

Una vez estabilizada, la fracción de membrana se incorporó en una matriz polimérica (es decir, una dispersión de emulsionante polimérico, polímero reticulado de acrilatos/C10-C30 acrilato). La matriz polimérica se preparó dispersando 0,9 gramos de Pemulen TR-2 en 692 gramos de agua desionizada caliente y mezclando hasta
 15 uniformidad usando agitación moderada, mientras se evita la aireación. En paralelo, se combinaron 5 gramos de glicerina y 1,0 gramo de Pheaonip (mezcla de fenoxietanol (y) metilparabeno (y) butilparabeno (y) etilparabeno (y) propilparabeno) en un recipiente separado y se mezcló hasta uniformidad. Con agitación moderada, las fases que contienen Pemulen y glicerina se combinaron y se mezclaron hasta uniformidad. Para incorporar la fracción de membrana en la matriz polimérica, la fase que contiene la fracción de membrana, Tween 80 y Tenox 4, se añadió a
 20 la fase que contiene el Pemulen, glicerina y Phenonip, y a continuación se mezcló con agitación enérgica mientras se evita la aireación. La estabilización de la mezcla de fracción de membrana se logró neutralizándola con solución acuosa al 18 % de hidróxido de sodio (NaOH) y se mezcló enérgicamente para producir un sistema uniforme que tiene un pH de $5,0 \pm 0,4$. Esta preparación, que se inició a partir de 100 kg de biomasa de *Camellia* fresca (aproximadamente 461 kg de hojas frescas que tienen un 21,7 % de materia seca), dio como resultado la
 25 producción de 11,85 kg de rendimiento de materia seca (o aproximadamente 172 litros) de ingrediente tópico MF, que se usó para la caracterización de sus cualidades fisicoquímicas y bioactivas. Las condiciones de almacenamiento recomendadas para el ingrediente tópico MF incluyen el almacenamiento en un recipiente cerrado protegido de la luz a una temperatura de entre 2 y 8 °C.

Ejemplo 8 - Especificaciones de producto del ingrediente tópico MF derivado de la fracción de membrana

30 Se preparó el ingrediente tópico MF de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en el ejemplo 7. Se realizaron análisis del ingrediente tópico MF para determinar sus diversas características fisicoquímicas, microbianas, de citotoxicidad y bioactividad, como se describe a continuación. El ingrediente tópico MF es un gel opaco, que tiene un color marrón verdoso y un olor característico suave. El ingrediente tópico MF se formuló utilizando los constituyentes del jugo celular natural gelificados con un polímero para garantizar el mayor nivel de
 35 pureza uniformidad, compatibilidad, estabilidad, seguridad y eficacia.

La tabla 8 describe los datos físicos y químicos del ingrediente tópico MF.

Tabla 8 - Parámetros físicos y químicos del ingrediente tópico MF

Parámetro	Procedimiento	Resultados
Residuo no volátil (RNV), %	Véase el ejemplo 10, "Procedimiento 2"	6,9
Gravedad específica, g/cm ³	USP <841>	1,035
Viscosidad, cps	USP <911>	18,700
pH	USP <791>	4,6
Carotenoides totales, % RNV	Véase el ejemplo 10, "Procedimiento 4"	0,36
Luteína, % RNV	Véase el ejemplo 10 20, "Procedimiento 4"	0,34

La tabla 9 resume los datos de los valores L*a*b* con relación al ingrediente tópico MF.

Tabla 9. - Valores L*a*D* del ingrediente tópico MF

Parámetro	Procedimiento	Resultados
L*	Véase el ejemplo 10, "Procedimiento 3"	30,27
a*	"-"	27,36
b*	"-"	42,56

Los análisis microbianos demostraron que el ingrediente tópico MF satisface los requisitos de la industria para los ingredientes tópicos con respecto a las CFU y ausencia de patógenos (USP <61>).

5 Se determinó que el ingrediente tópico MF era estable (es decir, mantenía la integridad física y química) durante al menos 12-18 meses mientras se almacene a una temperatura de entre 2 y 8 °C en un recipiente cerrado protegido de la luz. El ingrediente tópico MF es un producto biodegradable. En una evaluación clínica controlada, el ingrediente tópico MF demuestra actividad inhibidora de elastasa y actividad inhibidora de tripsina. La tabla 10 resume determinados resultados de bioactividad para el ingrediente tópico MF.

Tabla 10. - Resultados de bioactividad del ingrediente tópico MF

Actividad	Procedimiento	CI ₅₀ (µg/ml)
Inhibidor de elastasa (CI ₅₀)	Véase el ejemplo 10, "Procedimiento 5"	12,3
Inhibidor de MPM-9 (CI ₅₀)	Véase el ejemplo 10, "Procedimiento 6"	5,6
Inhibidor de tripsina (CI ₅₀)	Véase referencia [1]	3,8
Referencia: [1] Cannel et al, Planta Medica 54:10-14 (1988), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.		

10 La tabla 10 muestra que el ingrediente tópico MF demostró propiedades similares a las del ingrediente tópico SF (véase el ejemplo 6). Aunque el ingrediente tópico MF no tiene actividad eliminadora de superóxido, demuestra mayores actividades de inhibición enzimática específica que el ingrediente tópico SF. Por tanto, el ingrediente tópico MF, que se basa en la composición bioactiva B, se debe considerar como un potente ingrediente antiinflamatorio multifase que tiene aplicaciones amplias para el tratamiento de trastornos cutáneos.

Ejemplo 9 - Análisis espectrales de las composiciones bioactivas derivadas de plantas de *Camellia sinensis*

15 *Introducción a los análisis espectrales.* La radiación ultravioleta (UV) tiene efectos dañinos sobre la piel humana. Los efectos a corto plazo incluyen bronceado y quemaduras solares, mientras que los efectos a largo plazo de una exposición UV acumulativa incluyen el fotoenvejecimiento de la piel y un incremento en el riesgo de cáncer de piel. La lesión cutánea por exposición ultravioleta está mediada por un daño oxidativo, y varios extractos vegetales con actividad antioxidante son prometedores como agentes protectores: extracto de semilla de uva (Carini et al.,
 20 "Protective Effect of Procyanidines from Vitis vinifera Seeds on UV-Induced Photodamage: In vitro and In vivo Studies," Proceedings of the 19th IFSCC Congress 3:55-63 (1996), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad), licopeno (Di Mascio et al., "Lycopene as the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher," Archives of Biochemistry and Biophysics 274:532-8 (1989); y Ribaya-Mercado et al., "Skin Lycopene is Destroyed Preferentially Over β-Carotene During Ultraviolet Irradiation in Humans," Journal of Nutrition
 25 125:1854-9 (1995), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad), silimarina (Morazzoni et al., "Silybum marianum (Carduus marianus)," Fitoterapia 66:3-42 (1995); Katiyar et al., "Protective Effects of Silymarin Against Photocarcinogenesis in a Mouse Skin Model," Journal of the National Cancer Institute 89:556-66 (1997), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad), y en especial extracto de té verde que tiene mayor eficacia en comparación con extractos producidos a partir de otras fuentes vegetales (Katiyar et al., "Protection Against Ultraviolet-B Radiation-Induced Local and Systemic Suppression of Contact Hypersensitivity and Edema Responses in C3H/HeN Mice by Green Tea Polyphenols," Photochemistry and Photobiology 62:855-61 (1995); Ruch et al., "Prevention of Cytotoxicity and Inhibition of Intercellular Communication by Antioxidant Catechins Isolated from Chinese Green Tea," Carcinogenesis 10:1003-8 (1989); Wang et al., "Protection Against Ultraviolet B Radiation-Induced Photocarcinogenesis in Hairless Mice by Green Tea Polyphenols," Carcinogenesis 12:1527-30 (1991), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).

Se descubrió que las hojas de la planta de té (*Camellia sinensis*) tienen un alto contenido en polifenoles con actividad antioxidante que incluye (-)-epicatequina, (-)-epicatequina-3-galato, (-)-epigallocatequina, y (-) epigallocatequina-3-galato. El extracto de té verde ha demostrado actividad antioxidante frente al peróxido de hidrógeno y los radicales de superóxido y prevención de la citotoxicidad oxidativa. El extracto también puede prevenir la inhibición de la comunicación intercelular, un posible mecanismo de promoción tumoral. Existe una estrecha asociación entre la supresión inmunitaria inducida por UV y el desarrollo de cáncer de piel, y se ha descubierto que el extracto de té verde protege frente a la inflamación y la supresión inmunitaria provocada por la radiación UV-B. El extracto de té verde tomado por vía oral en agua potable o aplicado por vía tópica protege frente a la carcinogénesis cutánea inducida por UV-B en modelos animales. Estos resultados indican que el extracto de té verde tomado por vía oral puede ayudar a evitar el cáncer de piel.

Aunque se han establecido las propiedades de protección UV de los productos de *Camellia*, el mayor potencial de la planta de té como fuente para una protección eficaz de la piel frente al daño solar no se ha explorado completamente debido a las limitaciones de la tecnología convencional, que está orientada a centrarse en una banda de limitada a relativamente estrecha de ingredientes activos: de forma predominante catequinas.

Los estudios sobre las propiedades de protección UV comparativos descritos en el presente documento entre productos de *Camellia* "novedosos" y "convencionales" han demostrado ahora que la tecnología de "fraccionamiento de *Camellia* fresca" puede proporcionar productos más potentes. La comparación se realizó utilizando los procedimientos usados comúnmente para determinar las propiedades espectrales de las soluciones y el factor de protección solar (SPF) *in-vitro*.

Metodología A: Espectros UV/VIS. Se obtuvieron espectros UV/VIS de productos de *Camellia* en la región de 200 - 450 nm usando el espectrofotómetro que cumple con la farmacopea Ultrospec 4300 Pro (Amersham Biosciences Ltd., Buckinghamshire, Inglaterra). Los parámetros espectrales de productos de *Camellia* diluidos en agua destilada se determinaron de acuerdo con el procedimiento descrito en USP <197>.

Metodología B: Espectros de absorbancia. Se obtuvieron espectros de absorbancia de los productos de *Camellia* en la región de 250 - 450 nm usando el analizador de transmitancia UV-1000S (Labsphere, Inc., North Sutton, NH) y sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT), que imita las propiedades de superficie de piel humana. Contiene componentes tanto proteicos como lipídicos optimizados y está diseñado para tener topografía, pH, tensión de superficie crítica y fuerza iónica similar a la piel humana.

Las muestras de *Camellia* se pulverizaron uniformemente sobre una superficie de sustrato prehidratado (dosis de aplicación = 2,0 µl / cm²). Después de 15 min después de la aplicación, se tomaron los espectros de absorbancia inicial por medio de (5) repeticiones. A continuación, se irradiaron los sustratos con productos aplicados por un simulador de luz solar de amplio espectro (Modelo 16S-300 Single Port, Solar Light Company, Inc., Filadelfia, PA) equipado con una lámpara de xenón de 300 vatios. El sistema de control de dosis PMA 2100-DCS permitió un control de precisión de la dosis administrada a una muestra.

De inmediato después de la irradiación (dosis de irradiación = 60 Julios / cm²), se tomaron los espectros de absorbancia del mismo punto en (5) cinco repeticiones. Se usaron los espectros de absorbancia de las muestras antes y después de la irradiación para el análisis estadístico.

Muestras. Se evaluaron las siguientes composiciones bioactivas, que se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en el ejemplo 1: composición A (extracto de la fracción de paredes celulares que tienen un 0,84 % de materia seca), composición B (extracto de la fracción de membrana que tiene un 6,83 % de materia seca), composición D (suero de jugo celular que tiene un 5,69 % de materia seca). Como controles, se usaron extracto de té blanco convencional que tiene un 1,10 % de materia seca y extracto de té negro convencional que tiene un 1,38 % de materia seca. Se obtuvieron todas las muestras del mismo lote de *Camellia* fresca, que se recogió en Charleston Tea Plantation, SC. Estas muestras no contenían ningún aditivo.

Análisis. Se descubrió que todas las muestras de *Camellia* tienen valores de absorbancia UV altos y por tanto se diluyeron con agua destilada. Los espectros US - VIS de los productos de *Camellia* diluidos se presentan en las figuras 2 y 3.

Los espectros de todas las muestras líquidas tienen ciertas similitudes. Por ejemplo, las posiciones de los picos varían en intervalos relativamente estrechos $\lambda_{m\acute{a}x1} = 269 - 274$ nm y $\lambda_{m\acute{a}x2} = 205 - 208$ nm, lo que indica la presencia de anillos aromáticos y sistemas conjugados de enlaces $\sigma - \pi$ en todas las muestras sometidas a prueba. Sin embargo, el valor de cima de los picos, el área bajo cada pico y el área total bajo las curvas espectrales integrales son diferentes (tabla 11), lo que sugiere que las muestras sometidas a prueba tienen diferentes composiciones de constituyentes ópticamente activos.

Tabla 11 - Parámetros de espectros UV/VIS de productos de *Camellia*

	Pico n.º 1					Pico n.º 2					Área bajo la curva de los espectros*, Abs • nm
	Inicio, nm	$\lambda_{m\acute{a}x1}$, nm	Final, nm	Altura, Abs	Área, %	Inicio, nm	$\lambda_{m\acute{a}x2}$, nm	Final, nm	Altura, Abs	Área %	
Extracto de té blanco	450	269	250	0,114	28,1	250	205	200	0,816	71,9	6,604
Extracto de té negro	450	272	250	0,094	37,3	250	205	200	0,452	62,7	4,616
Extracto de fracción de paredes celulares	450	272	248	0,134	35,8	248	205	200	0,614	64,2	5,727
Extracto de fracción de membrana	450	274	251	0,944	16,2	251	208	200	11,98	83,8	80,133
Suero de jugo celular	450	271	249	0,692	26,3	249	205	200	5228	73,7	39,599

* Los valores del área bajo los espectros se normalizaron en base a la dilución de las muestras.

La comparación de las áreas bajo las curvas espectrales integrales obtenidas de 200 nm a 450 nm demuestra claramente que el extracto de la fracción de membrana (composición B) y el suero de jugo celular (composición D) tuvieron los mayores valores de absorción (tabla 11). La proporción de "área bajo los espectros : materia seca"

indica que el valor de absorción específico de las muestras es creciente en las siguiente secuencia: extracto de té negro > extracto de té blanco > extracto de fracción de paredes celulares > suero de jugo celular > extracto de fracción de membrana (tabla 12).

Tabla 12 - Características espectrales seleccionadas de los productos de *Camellia*

	Materia seca %	Área bajo los espectros, Abs • nm	Proporción: Área bajo los espectros (200-450 nm) Materia seca	Área bajo los espectros (290-400nm) Abs • nm	Proporción: Área bajo los espectros (290-400 nm) Materia seca
Extracto de té blanco	1,10	6,604	6,004	0,812	0,738
Extracto de té negro	1,38	4,616	3,345	0,854	0,619
Extracto de fracción de paredes celulares	0,84	5,727	6,818	0,776	0,924
Extracto de fracción de membrana	6,83	80,133	11,733	4,304	0,630
Suero de jugo celular	5,69	39,599	6,959	4,320	0,759

5 En base a la comparación de los valores de absorción, parece que las composiciones bioactivas novedosas son protectores de la piel más eficaces frente al daño solar que los extractos de té blanco y té negro convencionales. Cabe señalar que las propiedades de protección UV de los productos de *Camellia* se pueden estimar mejor usando datos de absorción relacionados con el área de 290 nm a 400 nm debido a que esta parte particular de los espectros es responsable del daño inducido por UV de la piel (Sayre et al., "A Method for the Determination of UVA Protection for Normal Skin," Journal of American Academy of Dermatology 23: 429-40 (1990), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). Aunque la absorción de las muestras líquidas sometidas a prueba en el área de 290-400 nm sólo contribuye al ~10 % de absorción de UV/VIS total, las composiciones de *Camellia* novedosas tienen además mayor absorción en el área espectral.

10 Por tanto, los datos relacionados con las soluciones diluidas de muestras de *Camellia* proporcionaron una estimación inicial de potencia de protección UV de los productos sometidos a prueba, que se evaluó adicionalmente usando el sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT). Los resultados se presentan en las figuras 4-13. Se descubrió que las composiciones de *Camellia* novedosas y los extractos de té blanco y té negro convencionales tienen características espectrales diferentes incluso después de que se aplicaran sobre el sustrato en concentraciones, que se igualaron con respecto al nivel de materia seca (Figuras 4 y 5).

15 Los espectros de muestras de *Camellia*, que se aplicaron en el sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT) incluyeron de cuatro a dos picos característicos, que tienen valores de cima diferentes (tabla 13).

Tabla 13 - Parámetros de espectros de absorbancia de productos de *Camellia* aplicados en el sustrato de prueba Vitro-Skin®

	Pico n.º 1		Pico n.º 2		Pico n.º 3		Pico n.º 4	
	λ _{máx4}	Altura, Abs	λ _{máx3}	Altura, Abs	λ _{máx2}	Altura, Abs	λ _{máx1}	Altura, Abs
Extracto de té blanco	260	0,389	286	0,461	330	0,163	392	0,076
Extracto de té negro	260	0,399	286	0,373	330	0,175	390	0,105
Extracto de fracción de pared celular	260	0,555	286	0,569	330	0,203	389	0,118
Extracto de fracción de membrana	260	0,394	286	0,549	-	-	394	0,059
Suero de jugo celular	260	0,431	286	0,517	-	-	-	-

25 Cabe señalar que los parámetros de los picos característicos de los productos de *Camellia* en las soluciones (tabla 11) fueron muy diferentes en comparación con los característicos de los productos de *Camellia*, que se aplicaron en el sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT) (tabla 13). Como muestran los experimentos de control, el menor nivel de pH (~ 5,5) sobre la superficie Vitro-Sin® no puede ser responsable de las diferencias anteriores, que probablemente son el resultado de interacciones químicas entre los productos de *Camellia* y los ingredientes usados para la preparación del sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT). Por tanto, el sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT) contiene componentes tanto proteicos como lipídicos que podrían interaccionar químicamente con los constituyentes fenólicos de *Camellia*. Cabe destacar

que se observaron desplazamientos en las propiedades espectrales de los productos sometidos a prueba para todas las composiciones bioactivas así como para los extractos de té convencionales.

5 También se compararon los espectros de composiciones de *Camellia* novedosas y extractos de productos de *Camellia* convencionales "como son", teniendo en cuenta los diferentes contenidos en materia seca de las muestras sometidas a prueba. Los espectros de absorbancia de los productos de *Camellia* aplicados en el sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT) en volúmenes iguales se presentan en la figura 6.

10 Aunque existen algunas similitudes entre los espectros del extracto de la fracción de paredes celulares y del extracto de té blanco, el primer producto tienen mayor absorbancia en el área de 250 - 280 nm y en el área de UV cercano. Cabe destacar que una mayor absorbancia no se corresponde con el nivel de materia seca, que es mayor en el extracto de té blanco (1,10 %) en comparación con el extracto de la fracción de paredes celulares (0,84 %). Esto sugiere que las composiciones de estas dos muestras no son idénticas y que el extracto de la fracción de paredes celulares también tienen menor conductividad que consiste en mayores ingredientes ópticamente activos no disociados responsables de la alta absorbancia (véanse los datos presentados en la tabla 3).

15 Adicionalmente, se descubrió que los espectros del extracto de la fracción de membrana (composición B) y del suero de jugo celular (composición D) son diferentes de los espectros del extracto de la fracción de paredes celulares (composición A) y del extracto de té blanco. Por tanto, los espectros del extracto de la fracción de membrana y del suero de jugo celular de nuevo indican que estos productos tienen una composición diferente del extracto de té blanco y del extracto de la fracción de paredes celulares. Al mismo tiempo, los datos espectrales sugieren que las composiciones del extracto de la fracción de membrana y del suero de jugo celular no son idénticas. Por ejemplo, el extracto de la fracción de membrana tiene tres picos característicos a 260 nm, 286 nm y 394 nm. Los espectros del suero de jugo celular contienen dos picos a 260 nm y 286 nm. La comparación de estos dos espectros indica que el extracto de la fracción de membrana tiene aproximadamente dos veces mayor extinción que el suero de jugo celular, aunque la diferencia en los niveles de materia seca sólo es del ~ 1 %. Por tanto, los cuatro productos de *Camellia* sometidos a prueba tienen composiciones de constituyentes significativamente diferentes, que son ópticamente activos en la región de 250 - 450 nm. Los datos relacionados con la comparación cuantitativa de los productos de *Camellia* se presentan en la tabla 14.

Tabla 14 - Características seleccionadas de productos de *Camellia* aplicados al sustrato de prueba Vitro-Skin®

	Área bajo los espectros (250-450 nm) Abs • nm	Área bajo los espectros (290-400 nm) Abs • nm	Área bajo los espectros ^(290-400 nm) Área bajo los espectros ^(250-450 nm) %
Extracto de té blanco	15,577	9,312	59,78
Extracto de fracción de paredes celulares	18,571	10,422	56,12
Extracto de fracción de membrana	89,148	53,803	60,35
Suero de jugo celular	60,861	35,161	57,77

30 La tabla 14 muestra que la absorción de las muestras en el área de 250 - 450 nm y en el área de 290 - 400 nm es creciente en el siguiente orden: extracto de té blanco > extracto de fracción de paredes celulares > suero de jugo celular > extracto de fracción de membrana. Esta secuencia está completamente de acuerdo con la secuencia de los valores de absorción específicos de los productos de *Camellia* sometidos a prueba en las soluciones diluidas (tabla 12). La contribución de la absorbancia en la región de 250 - 400 nm a la absorbancia de los espectros tomados de 250 nm a 450 nm alcanzó un ~ 55-60 % cuando se aplicaron las muestras sometidas a prueba en el sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT).

35 Cabe destacar que los espectros de las composiciones de *Camellia* novedosas en soluciones diluidas y después de su aplicación en el sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT) son sorprendentemente diferentes. Estas diferencias son tanto cuantitativas como cualitativas para el extracto de la fracción de membrana y el suero de jugo celular. Por lo tanto, en el intervalo de 250 nm a 450 nm el extracto de la fracción de membrana en solución alcanza su nivel máximo a 274 nm. El mismo extracto de la fracción de membrana cuando se aplica en el sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT), no mostró ningún pico característico en la longitud de onda anterior, pero en cambio tuvo dos picos característicos a 260 nm y 286 nm (figura 7A).

40 Se observó el patrón similar en las propiedades espectrales para el suero de jugo celular, aunque se identificó la absorción adicional a ~ 360 nm en la muestra aplicada en el sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT), pero dicho fenómeno no se registró en los espectros UV/VIS de la misma composición en la solución (figura 7B).

45 Cabe señalar que las diferencias anteriores entre los espectros pueden ser el resultado de la interacción química entre las composiciones de *Camellia* novedosas y la superficie del sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT) que tiene componentes proteicos y lipídicos, que imitan la piel humana. Estas interacciones dan

- lugar al incremento drástico de la absorbancia en la región espectral responsable del efecto dañino de la irradiación UV, es decir, las composiciones de *Camellia* novedosas tienen potencias de protección UV significativas. Los experimentos de control con sueros de jugo celular de cebada (*Hordeum vulgare*) (figura 8A) y salvia (*Salvia officinalis*) (figura 8B) mostraron que las diferencias en los espectros de las mismas muestras en solución y después de su aplicación en el sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT) no se observaron para fuentes vegetales distintas de *Camellia*. Por tanto, el desplazamiento espectral en los productos de *Camellia* después de su aplicación en el sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT) indica las interacciones específicas que tienen lugar sólo entre los productos de *Camellia* novedosos y el sustrato que imita la piel humana.
- Los experimentos de control con sustrato prehidratado demostraron que después de la irradiación la absorbancia del sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT) disminuyó significativamente, en especial en el intervalo de 260 - 330 nm (figura 9). Este efecto refleja una fotoestabilidad relativamente baja del sustrato no protegido, que se irradió por dosis alta de luz solar de amplio espectro.
- La irradiación del sustrato con el extracto de té blanco aplicado inició cambios en los espectros de absorbancia (figura 10) lo que es análogo a los cambios espectrales del sustrato de prueba Vitro-Skin® no protegido (IMS Testing Group, Milford, CT). Cuando se eliminó la contribución del sustrato, los espectros de muestra no irradiada e irradiada indicaron alguna similitud pero no demostró un comportamiento totalmente idéntico. Por ejemplo, la absorbancia en el intervalo de 290 - 310 nm disminuyó y se empezó a formar un pico ancho a 360 nm.
- La irradiación del extracto de la fracción de paredes celulares (figura 11) dio lugar a cambios similares en los espectros de absorbancia, en especial con respecto a la curva obtenida después de la eliminación (sustracción) de la contribución del sustrato.
- Aunque las composiciones del extracto de té blanco y del extracto de la fracción de paredes celulares no son idénticas, el patrón de las modificaciones inducidas por irradiación en sus espectros es bastante similar. Cabe destacar que tanto el extracto de té blanco como el extracto de la fracción de paredes celulares no pueden proteger completamente el sustrato frente a la acción destructiva de la irradiación y como resultado, la absorbancia del sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT) disminuye casi tanto como en la condición en la que este sustrato no está en absoluto protegido (figura 9). Esto es especialmente obvio en el intervalo de 250 nm - 330 nm aunque a mayores longitudes de onda se observa cierto incremento en la absorbancia.
- La irradiación del extracto de la fracción de membrana produjo un efecto muy diferente sobre sus espectros de absorbancia (figura 12). Por ejemplo, la irradiación no inició ningún cambio en el intervalo espectral de 250 - 285 nm. Como se analiza, este intervalo particular de espectros se vio afectado muy significativamente por la destrucción del sustrato de prueba Vitro-Skin® irradiado (IMS Testing Group, Milford, CT) y por lo tanto la comparación de los espectros sugiere que la destrucción del sustrato se evitó completamente por presencia del extracto de la fracción de membrana sobre su superficie.
- Sin embargo, se registraron ciertos cambios en los espectros del extracto de la fracción de membrana. Por ejemplo, la absorbancia disminuyó ligeramente en el intervalo de 290 - 320 nm y se acompañó de un pequeño incremento de la absorbancia a mayores longitudes de onda. Cabe señalar en especial que se probó que el extracto de la fracción de membrana era muy eficaz en el intervalo de espectros en el que los ácidos nucleicos y los aminoácidos aromáticos tienen picos característicos a 260 nm y 280 nm posteriormente. Por tanto, el efecto del extracto de la fracción de membrana permite el uso de este producto como posible ingrediente protector de UV para aplicaciones tópicas.
- Después de la irradiación, la fracción de suero demostró ciertos cambios en sus espectros de absorbancia (figura 13). En general, estos cambios se pueden describir como una ligera disminución en la absorción en el intervalo de 250 - 340 nm y un ligero incremento en la absorción en el intervalo de 340 - 450 nm. Cabe destacar que la eliminación de la posible contribución proporcionada por la fotodestrucción del sustrato de prueba Vitro-Skin® (IMS Testing Group, Milford, CT) (véase la curva roja en los espectros por encima de los espectros iniciales de la fracción de suero no irradiada) indicó claramente que el sustrato se preservó eficazmente por la aplicación de la fracción de suero sobre su superficie.
- Observaciones y conclusiones.** Los resultados anteriores muestran claramente que el mejor de los productos de *Camellia* convencionales (extracto de té blanco) proporciona una protección relativamente débil frente a acción destructora de la irradiación UV. El extracto de la fracción de paredes celulares demostró propiedades similares al extracto de té blanco, pero el extracto de la fracción de membrana y el suero de jugo celular tienen propiedades protectoras de UV mucho más potentes.
- Se descubrió que las propiedades de protección UV de los productos de *Camellia* eran crecientes en la siguiente secuencia: extracto de té blanco = extracto de la fracción de paredes celulares > suero de jugo celular > extracto de fracción de membrana.

Cabe destacar que las propiedades espectrales de los productos de *Camellia* y el patrón de los cambios de estas propiedades después de la irradiación UV proporcionan pruebas sólidas de que los constituyentes en el extracto de té blanco (control), extracto de la fracción de paredes celulares, extracto de la fracción de membrana y suero de jugo celular difieren todos y presentan actividades únicas. Es de particular interés en el caso de composiciones de *Camellia* novedosas en las que la actividad UV descrita anteriormente no se puede atribuir a polifenoles como con los extractos de té blanco.

Ejemplo 10 - Protocolos usados para determinar determinadas características de las composiciones bioactivas

Los siguientes son varios procedimientos usados para determinar determinadas características de las composiciones bioactivas. Estos procedimientos están referenciados en todos los ejemplos anteriores. Las referencias a continuación a los "productos sometidos a prueba" o a las "muestras de prueba" se refieren a composiciones bioactivas.

Procedimiento 1: Procedimiento para la determinación de contenido sólido. El procedimiento para la determinación de contenido sólido incluyó la evaporación de la composición bioactiva sometida a prueba en el baño de agua a 100 °C hasta la completa evaporación del agua, almacenamiento en horno de la muestra a 105 °C durante 3 horas, enfriamiento hasta temperatura ambiente y determinación inmediata del peso del recipiente con la materia sólida.

Procedimiento 2: Procedimiento para la determinación del residuo no volátil. El procedimiento para la determinación del residuo no volátil incluyó almacenamiento en horno de la composición bioactiva sometida a prueba a 105 °C durante 5 horas, enfriamiento y determinación inmediata del peso del recipiente con materia sólida.

*Procedimiento 3: Procedimiento para la determinación de los valores de L*a*b*.* El procedimiento para la determinación de los valores de L*a*b* utilizó un colorímetro de geometría fijada Hunter Labscan con geometría de medida de 0°/45°. Se usó iluminante estándar D₆₅ con la ventana de visualización orientada hacia arriba. El recipiente con la composición bioactiva sometida a prueba se colocó sobre la ventana de visualización y se midió a través del fondo. Se usaron las siguientes ecuaciones CIELAB:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$DE^* = [(DL)^2 + (Da^*)^2 + (Db^*)^2]^{1/2}$$

$$DH = [(\overline{DE^*})^2 - (\overline{DL^*})^2 - (\overline{DC^*})^2]^{1/2}$$

Procedimiento 4: Procedimiento para la determinación de contenido en carotenoides totales y contenido en luteína. Las composiciones bioactivas sometidas a prueba se extrajeron con acetona. Después de la homogeneización y filtración al vacío, se saponificaron todos los extractos con hidróxido de potasio al 30 % en metanol. Los carotenoides se extrajeron sucesivamente de las composiciones bioactivas con éter de petróleo. Después de tratamiento adicional y resolubilización en etanol, se midieron todas las muestras a 446 nm.

Para determinar el contenido en luteína, se usó una muestra secada adicional de cada extracción de muestra para el análisis de cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC"). La muestra secada se resolubilizó en MTBE y metanol. Se usó el sistema HPLC de fase inversa con columna C₁₈ 5 µm (250 x 4,60 mm I.D.) ("Vydac"). Se conformó la identidad de luteína por la co-cromatografía de un estándar auténtico. El coeficiente de absorptividad molar para luteína en etanol es de 144,800 cm⁻¹ mol⁻¹.

Procedimiento 5: Procedimiento para la determinación de la actividad inhibidora de elastasa. Se determinó la actividad inhibidora de elastasa de las composiciones bioactivas sometidas a prueba usando el ensayo, que emplea elastasa neutrófila (un preparación de enzima purificada producida por "productos de elastina") y sustrato soluble en péptido sintético metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Val-p-Ni-troanilida producido por "Sigma". La escisión enzimática del sustrato da como resultado la generación de color amarillo creciente con el tiempo (405 nm); la tasa de generación de color disminuye incrementando las concentraciones de las composiciones bioactivas sometidas a prueba que contienen actividad inhibidora. El análisis de la dependencia de concentración de la inhibición permite la cuantificación de la potencia de la actividad inhibidora, expresada como la concentración de materia seca dentro de cada composición bioactiva sometida a prueba requerida para lograr una inhibición del 50 % (CI₅₀), pero también proporciona información relacionada con el modo de inhibición.

Para la determinación de CI₅₀, la concentración de elastasa fue de 2,5µg/ml y la concentración de sustrato fue de 150 µM. Para la determinación de K_i, las concentraciones de sustrato fueron de 100 µM y 200 µM.

Procedimiento 6: Procedimiento para la determinación de la actividad inhibidora de gelatinasa B (MPM-9). El ensayo comercialmente distribuido (ELISA de actividad MPM-9 producido por "Amersham Pharmacia"), que captura la gelatinasa B específicamente sobre microplacas de multipocillos por reconocimiento inmunitario, se usó después de que se retiraran por lavado otras proteinasas. Se detectó la actividad enzimática a 405 nm por hidrólisis de un sustrato sintético de bajo peso molecular para gelatinasa B: APMA. Se usó el análisis de la dependencia de concentración de inhibición para determinar la potencia de la materia seca de la composición bioactiva sometida a prueba.

Procedimiento 7: Procedimiento para la determinación de la actividad eliminadora de superóxido. Se usó el sistema enzimático, que usa xantina oxidasa (una preparación de enzima purificada producida por "Sigma"), para generar aniones de superóxido en alto rendimiento y de forma controlada. La conversión de xantina a hidroxantina por esta enzima genera cantidades de aniones de superóxido y se usó la reducción de ferricitocromo c a ferrocitocromo c como medida sensible de los niveles de superóxido. Las medidas del nivel de ferrocitocromo c (550 nm), cuando se añadieron las composiciones bioactivas sometidas a prueba al sistema de reacción, permiten la determinación de su actividad inhibidora de superóxido. Las concentraciones finales por pocillo fueron para citocromo μ M75 xantina 425 mm/l, y xantina oxidasa 10 mU/ml.

Procedimiento 8: Procedimiento para la determinación de la toxicidad in vitro y apoptosis. Se exploraron el ensayo de proliferación celular CellTiter 96 Aqueous One solution y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96 y protocolos posteriores (ambos ensayos producidos por Promega Corporation, Madison, WI).

El primer ensayo es un procedimiento colorimétrico para determinar el número de células viables que explora un compuesto de tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal inerte; MTS y un reactivo de acoplamiento de electrones (fenazina metosulfato; PMS). El MTS se reduce por las células en un producto de formazano de medio de cultivo soluble en tejido que tiene un máximo en la absorbancia a 490 nm. La conversión de MTS en formazano soluble acuoso se lleva a cabo por enzimas deshidrogenasas halladas en células metabólicamente activas y la cantidad de producto de formazano es directamente proporcional al número de células vivientes en el cultivo.

El segundo ensayo mide cuantitativamente la lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citosólica estable que se libera tras la lisis celular. La LDH liberada en sobrenadante de cultivo celular se mide con un ensayo enzimático acoplado de 30 minutos, que da como resultado la conversión de una sal de tetrazolio (INT) en un producto de formazano rojo. La cantidad de color formado es proporcional al número de células lisadas.

Procedimiento 9: Procedimiento para la determinación del nivel de enzimas secretadas por células estimuladas. Después de la incubación con PMA, las células Mono Mac 6 secretan dos metaloproteinasas de matriz gelatinolíticas, MPM-2 (gelatinasa A) y MPM-9 (gelatinasa B). Se determinaron los niveles de estas enzimas en presencia de las composiciones bioactivas sometidas a prueba por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio bidimensional.

Ejemplo 11 - Líneas celulares usadas para someter a prueba determinadas características de los productos de *Camellia*

La línea celular MDA-MB-435S que se considera un modelo de cáncer de mama avanzado se obtuvo de American Type Culture Collection (número ATCC HTB-129). Esta línea celular se cultivó a 37 °C en el siguiente medio ATCC: Medio L-15 de Leibovitz con L-glutamina 2 mM complementado con 0,01 mg/ml de insulina, 90 %; suero fetal bovino, 10 %. La línea celular MCF-7 que se considera un modelo de cáncer de mama temprano o poco diferenciado se obtuvo de ATCC (número HTB-22), se cultivó a 37 °C en el siguiente medio ATCC: medio esencial mínimo (Eagle) con L-glutamina 2 mM y BSS de Earle ajustado para contener 1,5 g/l de bicarbonato de sodio, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y piruvato de sodio 1 mM y complementado con 0,01 mg/ml de insulina bovina, 90 %; suero fetal bovino, 10 %.

La línea celular MonoMac6 (MM6, obtenida de The German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) que se asemeja mucho a un monocito humano diferenciado (Ziegler-Heitbrock et al., "Establishment of a Human Cell Line (Mono Mac 6) with Characteristics of Mature Monocytes," International Journal of Cancer 41:456-461 (1988)). Las células se mantuvieron en RPMI 1640, complementado con L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, piruvato de sodio 1 mM, FCS al 10 %, aminoácidos no esenciales, 9 μ g/ml de insulina, y ácido oxalacético 1 mM. Para las condiciones de ensayo, también se añadió glucosa al 0,2 %.

Ejemplo 12 - Análisis de catequina de los productos de *Camellia*

Se analizaron el extracto de la fracción de paredes celulares, el extracto de la fracción de membrana, y el suero de jugo celular de la presente invención para determinar el contenido en diversas catequinas. Se usó una muestra de té blanco como control. Se sometieron a ensayo las siguientes catequinas: (-)-epigalocatequina; (+)-catequina; (-)-epicatequina; galato de (-)-epigalocatequina; galato de (-)-galocatequina; y galato de (-)-epicatequina.

Se extrajeron las muestras usando H₃PO₄ al 0,1 % y sonicación durante aproximadamente 15 minutos. Después de la centrifugación, se inyectó el extracto en HPLC. Se usó la columna de fase inversa C-18 como fase estacionaria.

Se usaron ácido fosfórico al 0,1 % y acetonitrilo como fases móviles. La detección fue a 280 nm. El cálculo se basa en comparar áreas de cada catequina enumerada con su estándar puro. Los resultados se muestran en la figura 38 y en la tabla 15 (dada a continuación).

Tabla 15 - Contenido en catequina de las composiciones bioactivas de *Camellia*

Muestra	Producto químico analizado	Promedio mg/g basado en 100 % de materia seca	Promedio mg/g basado en producto como tal
Extracto de té blanco	(-)-epigallocatequina	0,3	0,0033
	(+)-catequina	1,33	0,0146
	(-)-epicatequina	0,15	0,0017
	galato de (-)-epigallocatequina	0,65	0,0071
	galato de (-)-galocatequina	0,003	0,0000
	galato de (-)-epicatequina	0,212	0,0023
extracto de la fracción de paredes celulares	(-)-epigallocatequina	0,00	0,0000
	(+)-catequina	2,39	0,0201
	(-)-epicatequina	0,01	0,0001
	galato de (-)-epigallocatequina	0,01	0,0001
	galato de (-)-galocatequina	0,00	0,0000
	galato de (-)-epicatequina	0,006	0,0001
extracto de la fracción de membrana	(-)-epigallocatequina	2,27	0,1552
	(+)-catequina	8,96	0,6121
	(-)-epicatequina	0,60	0,0409
	galato de (-)-epigallocatequina	9,28	0,6340
	galato de (-)-galocatequina	0,01	0,0006
	galato de (-)-epicatequina	2,33	0,1589
suero de jugo celular	(-)-epigallocatequina	3,01	0,1714
	(+)-catequina	6,09	0,3465
	(-)-epicatequina	0,95	0,0539
	galato de (-)-epigallocatequina	1,97	0,1120
	galato de (-)-galocatequina	0,04	0,0024
	galato de (-)-epicatequina	0,57	0,0325

REIVINDICACIONES

1. Una fracción bioactiva de una planta de *Camellia* para su uso en la inhibición de la actividad inflamatoria en tejido cutáneo de un mamífero, o para su uso en la protección de tejido cutáneo de un mamífero del daño inducido por luz ultravioleta, o para su uso en la normalización de trastornos cutáneos en tejido cutáneo de un mamífero, aplicando la fracción bioactiva al tejido cutáneo del mamífero,
- 5 en la que la fracción bioactiva se ha aislado de la planta de *Camellia* mediante las etapas de:
- proporcionar biomasa fresca de planta de *Camellia*, en la que la biomasa fresca es biomasa de planta de *Camellia* fresca que no ha sufrido ningún procesamiento de té convencional;
- 10 moler, macerar y prensar la biomasa fresca de la planta de *Camellia* para separar la biomasa fresca en jugo celular y componentes de la pared celular;
- someter el jugo celular a tratamiento con microondas para inducir la coagulación, proporcionando de este modo una fracción de membrana coagulada y jugo celular no coagulado; y
- aislar la fracción bioactiva de la fracción de membrana coagulada,
- 15 en la que la fracción bioactiva es la fracción de membrana o un extracto de la fracción de membrana,
- en la que la fracción de membrana se aísla separando la fracción de membrana coagulada del jugo celular no coagulado usando centrifugación y, en la que el extracto de la fracción de membrana se aísla sometiendo la fracción de membrana a extracción con disolvente con dimetilsulfóxido y a continuación centrifugación para proporcionar un sobrenadante que comprende el extracto de la fracción de membrana.
2. La fracción bioactiva para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el extracto de la fracción de membrana tiene un contenido en catequina total de entre aproximadamente 15,0 y aproximadamente 30,5 miligramos por gramo de materia seca.
- 20 3. La fracción bioactiva para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el extracto de la fracción de membrana tiene un perfil de contenido en catequina que comprende:
- 25 entre aproximadamente 1,7 y aproximadamente 3,3 miligramos de (-)-epigalocatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana,
- entre aproximadamente 6,1 y aproximadamente 10,2 miligramos de (+)-catequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana,
- entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 1,1 miligramos de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana,
- 30 entre aproximadamente 6,2 y aproximadamente 12,5 miligramos de galato de (-)-epigalocatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana,
- entre aproximadamente 0,007 y aproximadamente 0,03 miligramos de galato de (-)-galocatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana, y
- 35 entre aproximadamente 1,3 y aproximadamente 3,3 miligramos de galato de (-) -epicatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de membrana.
4. Una fracción bioactiva de una planta de *Camellia* para su uso en la inhibición de la actividad inflamatoria en tejido cutáneo de un mamífero, o para su uso en la protección de tejido cutáneo de un mamífero del daño inducido por luz ultravioleta, o para su uso en la normalización de trastornos cutáneos en tejido cutáneo de un mamífero, aplicando la fracción bioactiva al tejido cutáneo del mamífero, en la que la fracción bioactiva se ha aislado de la planta de *Camellia* por las etapas de:
- 40 proporcionar biomasa fresca de planta de *Camellia*, en la que la biomasa fresca es biomasa de planta de *Camellia* fresca que no ha sufrido ningún procesamiento de té convencional;
- moler, macerar y prensar la biomasa fresca de la planta de *Camellia* para separar la biomasa fresca en jugo celular y componentes de la pared celular;
- 45 someter el jugo celular a tratamiento con microondas para inducir la coagulación, proporcionando de este modo una fracción de membrana coagulada y jugo celular no coagulado; y
- aislar la fracción bioactiva del jugo celular no coagulado, en la que la fracción bioactiva es suero de jugo celular,

en la que el suero de jugo celular se aísla sometiendo el jugo celular no coagulado a coagulación por precipitación isoeléctrica y centrifugación, proporcionando de este modo un líquido sobrenadante que comprende el suero de jugo celular.

5. La fracción bioactiva para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el suero de jugo celular tiene un contenido en catequina total de entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 20,0 miligramos por gramo de materia seca.
6. La fracción bioactiva para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el suero de jugo celular tiene un perfil de contenido en catequina que comprende:
- entre aproximadamente 2,1 y aproximadamente 4,4 miligramos de (-)-epigalocatequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular,
- entre aproximadamente 4,2 y aproximadamente 8,6 miligramos de (+)-catequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular,
- entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 2,0 miligramos de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular,
- entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 3,2 miligramos de galato de (-)-epigalocatequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular,
- entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,1 miligramos de galato de (-)-galocatequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular, y
- entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 1,3 miligramos de galato de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del suero de jugo celular.
7. Una fracción bioactiva de una planta de *Camellia* para su uso en la protección de tejido cutáneo de un mamífero del daño inducido por luz ultravioleta, aplicando la fracción bioactiva al tejido cutáneo del mamífero, en la que la fracción bioactiva se ha aislado de la planta de *Camellia* mediante las etapas de:
- proporcionar biomasa fresca de planta de *Camellia*, en la que la biomasa fresca es biomasa de planta de *Camellia* fresca que no ha sufrido ningún procesamiento de té convencional;
- separar la biomasa fresca de la planta de *Camellia* en jugo celular y un componente de paredes celulares, en la que dicha separación comprende moler, macerar y prensar la biomasa fresca para separar la biomasa en el jugo celular y el componente de paredes celulares;
- tratar el componente de paredes celulares en condiciones eficaces para proporcionar una fracción bioactiva, en la que la fracción bioactiva es el extracto de la fracción de paredes celulares; y
- en la que el extracto de la fracción de paredes celulares se aísla sometiendo el componente de paredes celulares a secado usando tratamiento con microondas y a continuación mezclar el material secado con agua.
8. La fracción bioactiva para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el extracto de la fracción de paredes celulares tiene un contenido en catequina total de entre aproximadamente 2,1 y aproximadamente 4,5 miligramos por gramo de materia seca.
9. La fracción bioactiva para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el extracto de la fracción de paredes celulares tiene un perfil de contenido en catequina que comprende:
- entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 3,0 miligramos de (+)-catequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de paredes celulares,
- entre aproximadamente 0,005 y aproximadamente 0,02 miligramos de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de paredes celulares,
- entre aproximadamente 0,005 y aproximadamente 0,02 miligramos de galato de (-)-epigalocatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de paredes celulares,
- entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 0,01 miligramos de galato de (-)-epicatequina por gramo de materia seca del extracto de la fracción de paredes celulares.
10. La fracción bioactiva para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la planta de *Camellia* está seleccionada del grupo que consiste en *Camellia sinensis*, *Camellia japonica*, *Camellia reticulata* y *Camellia sasanqua*.

11. La fracción bioactiva para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la fracción bioactiva está en una composición que comprende además un agente de estabilización.
- 5 12. La fracción bioactiva para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el agente de estabilización está seleccionado del grupo que consiste en un emulsionante, un conservante, un antioxidante, una matriz polimérica, y mezclas de los mismos.
13. La fracción bioactiva para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la fracción bioactiva está en una composición que comprende además un vehículo tópicamente aceptable.
- 10 14. La fracción bioactiva para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el vehículo tópicamente aceptable está seleccionado del grupo que consiste en una base de crema hidrófila, una base de loción hidrófila, una base de tensioactivo hidrófila, una base de gel hidrófila, una base de solución hidrófila, una base de crema hidrófoba, una base de loción hidrófoba, una base de tensioactivo hidrófoba, una base de gel hidrófoba y una base de solución hidrófoba.
- 15 15. La fracción bioactiva para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la fracción bioactiva está presente en una cantidad que varía de entre aproximadamente un 0,001 por ciento y aproximadamente un 90 por ciento del peso total de la composición.
16. La fracción bioactiva para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el daño inducido por luz ultravioleta está provocado por luz ultravioleta en un intervalo de entre aproximadamente 320 y aproximadamente 400 nanómetros.
- 20 17. Uso de una fracción bioactiva de una planta de *Camellia* en la preparación de un medicamento para inhibir la actividad inflamatoria en tejido cutáneo de un mamífero, o para proteger el tejido cutáneo de un mamífero del daño inducido por luz ultravioleta, o para normalizar trastornos cutáneos en tejido cutáneo de un mamífero, aplicando el medicamento al tejido cutáneo del mamífero, en la que la fracción bioactiva se ha aislado de la planta de *Camellia* por las etapas de:
- 25 proporcionar biomasa fresca de planta de *Camellia*, en la que la biomasa fresca es biomasa de planta de *Camellia* fresca que no ha sufrido ningún procesamiento de té convencional;
- moler, macerar y prensar la biomasa fresca de la planta de *Camellia* para separar la biomasa fresca en jugo celular y componentes de la pared celular;
- someter el jugo celular a tratamiento con microondas para inducir la coagulación, proporcionando de este modo una fracción de membrana coagulada y jugo celular no coagulado; y
- 30 aislar la fracción bioactiva de la fracción de membrana coagulada, en la que la fracción bioactiva es la fracción de membrana o un extracto de la fracción de membrana,
- 35 en la que la fracción de membrana se aísla separando la fracción de membrana coagulada del jugo celular no coagulado usando centrifugación y, en la que el extracto de la fracción de membrana se aísla sometiendo la fracción de membrana a extracción con disolvente con dimetilsulfóxido y a continuación centrifugación para proporcionar un sobrenadante que comprende el extracto de la fracción de membrana.
- 40 18. Uso de una fracción bioactiva de una planta de *Camellia* en la preparación de un medicamento para inhibir la actividad inflamatoria en tejido cutáneo de un mamífero, o para proteger el tejido cutáneo de un mamífero del daño inducido por luz ultravioleta, o para normalizar trastornos cutáneos en tejido cutáneo de un mamífero, aplicando el medicamento al tejido cutáneo del mamífero, en la que la fracción bioactiva se ha aislado de la planta de *Camellia* por las etapas de:
- 45 proporcionar biomasa fresca de planta de *Camellia*, en la que la biomasa fresca es biomasa de planta de *Camellia* fresca que no ha sufrido ningún procesamiento de té convencional;
- moler, macerar y prensar la biomasa fresca de la planta de *Camellia* para separar la biomasa fresca en jugo celular y componentes de la pared celular;
- 50 someter el jugo celular a tratamiento con microondas para inducir la coagulación, proporcionando de este modo una fracción de membrana coagulada y jugo celular no coagulado; y
- aislar la fracción bioactiva del jugo celular no coagulado, en la que la fracción bioactiva es suero de jugo celular,
- en la que el suero de jugo celular se aísla sometiendo el jugo celular no coagulado a coagulación por precipitación isoeléctrica y centrifugación, proporcionando de este modo un líquido sobrenadante que comprende el suero de jugo celular.

19. Uso de una fracción bioactiva de una planta de *Camellia* en la preparación de un medicamento para proteger el tejido cutáneo de un mamífero del daño inducido por luz ultravioleta, aplicando el medicamento al tejido cutáneo del mamífero, en el que la fracción bioactiva se ha aislado de la planta de *Camellia* por las etapas de:
- 5 proporcionar biomasa fresca de planta de *Camellia*, en la que la biomasa fresca es biomasa de planta de *Camellia* fresca que no ha sufrido ningún procesamiento de té convencional;
- separar la biomasa fresca de la planta de *Camellia* en jugo celular y un componente de paredes celulares, en la que dicha separación comprende moler, macerar y prensar la biomasa fresca para separar la biomasa en el jugo celular y el componente de paredes celulares;
- 10 tratar el componente de paredes celulares en condiciones eficaces para proporcionar una fracción bioactiva, en la que la fracción bioactiva es el extracto de la fracción de paredes celulares; y
- en la que el extracto de la fracción de paredes celulares se aísla sometiendo el componente de paredes celulares a secado usando tratamiento con microondas y a continuación mezclar el material secado con agua.

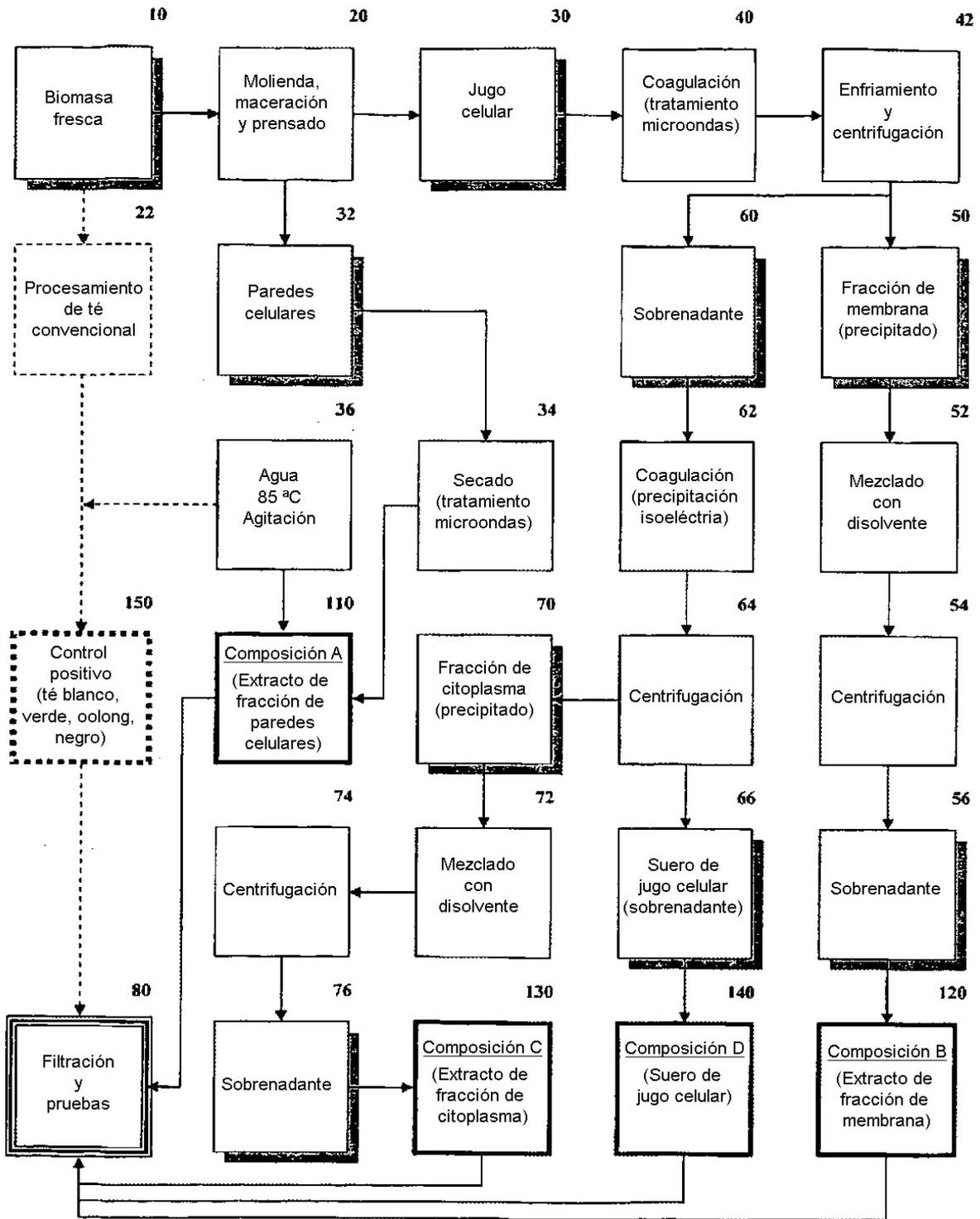


Fig. 1

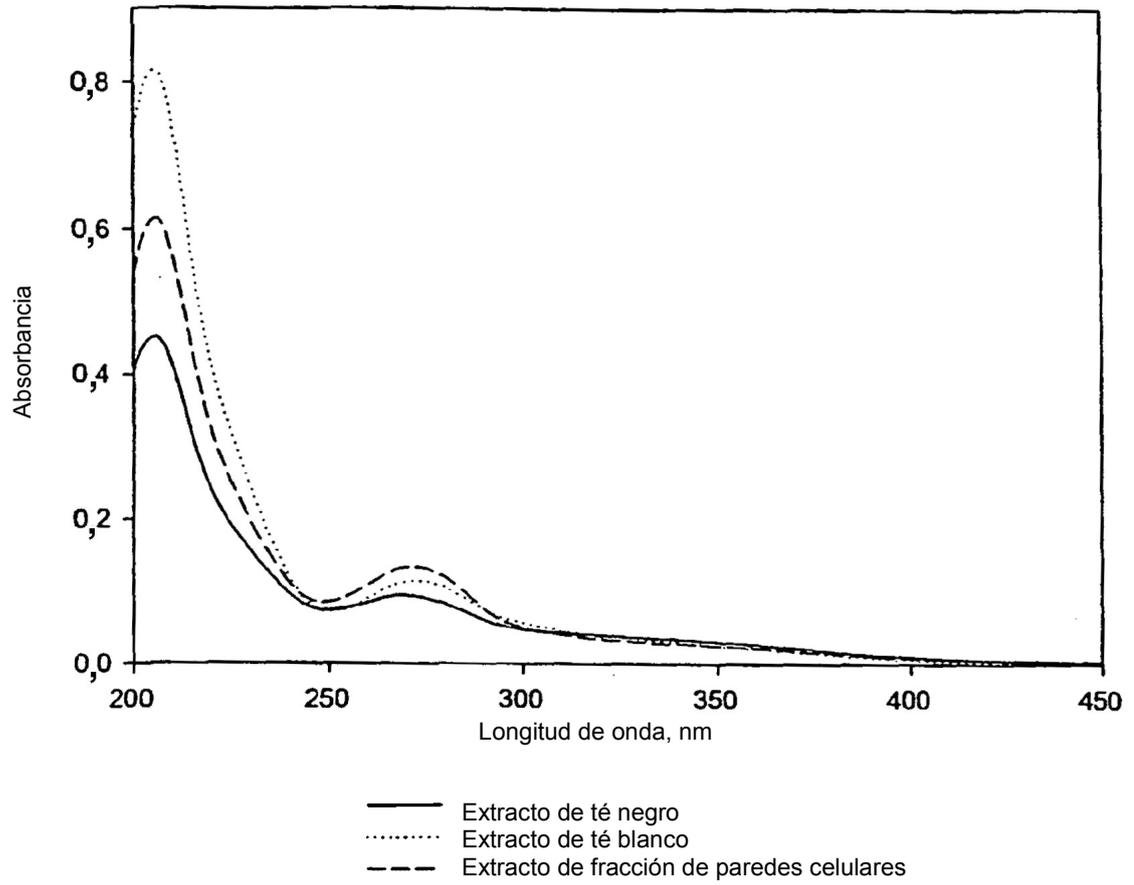


Figura 2

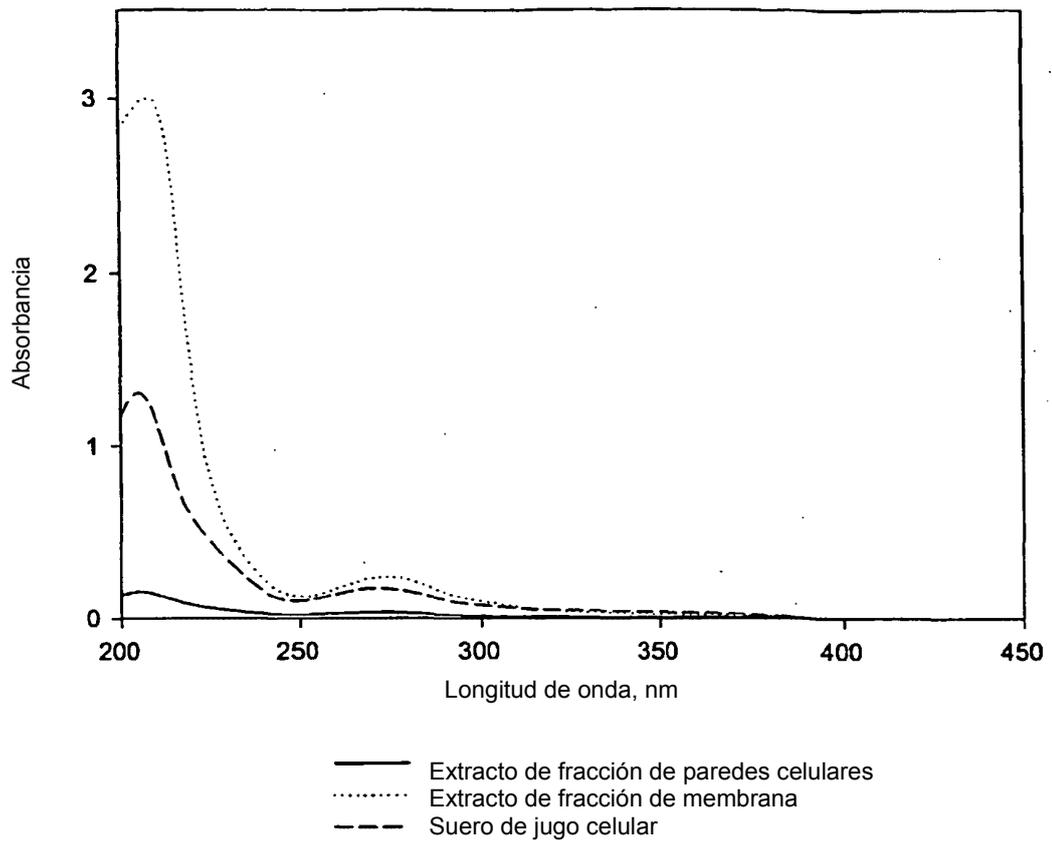


Figura 3

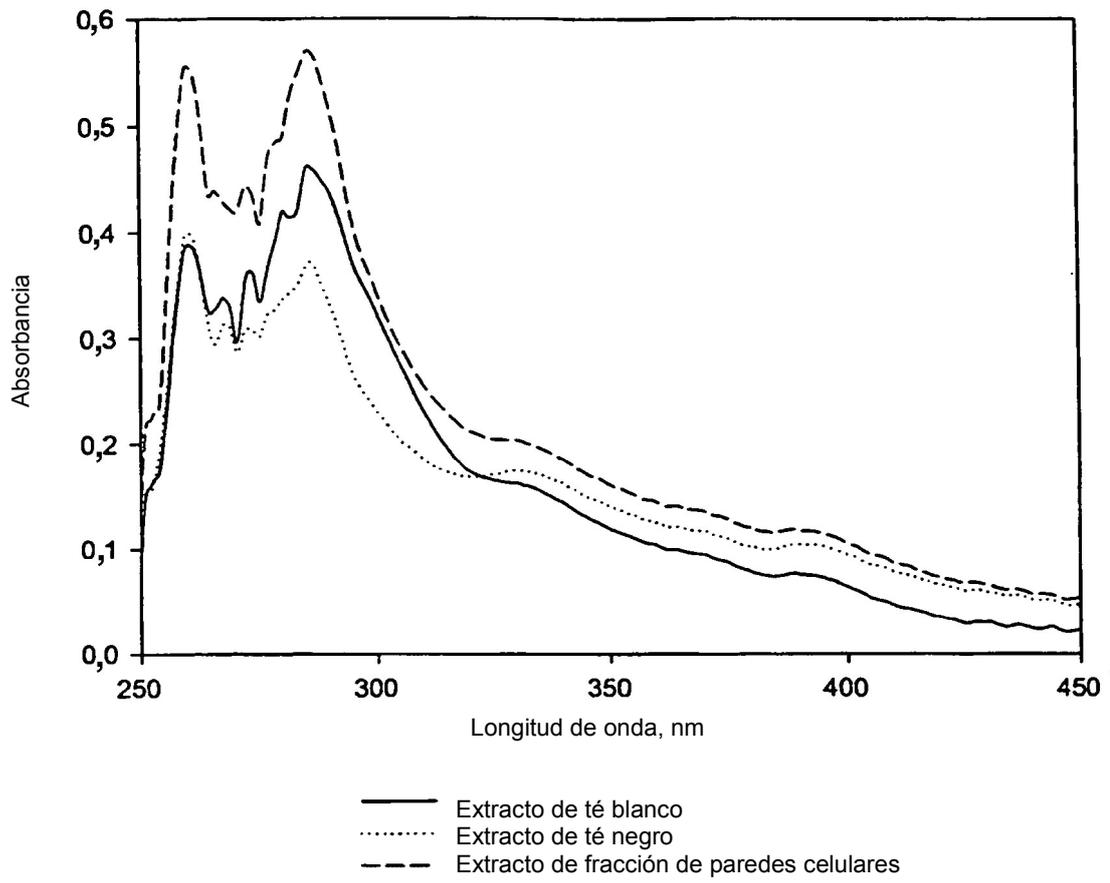


Figura 4

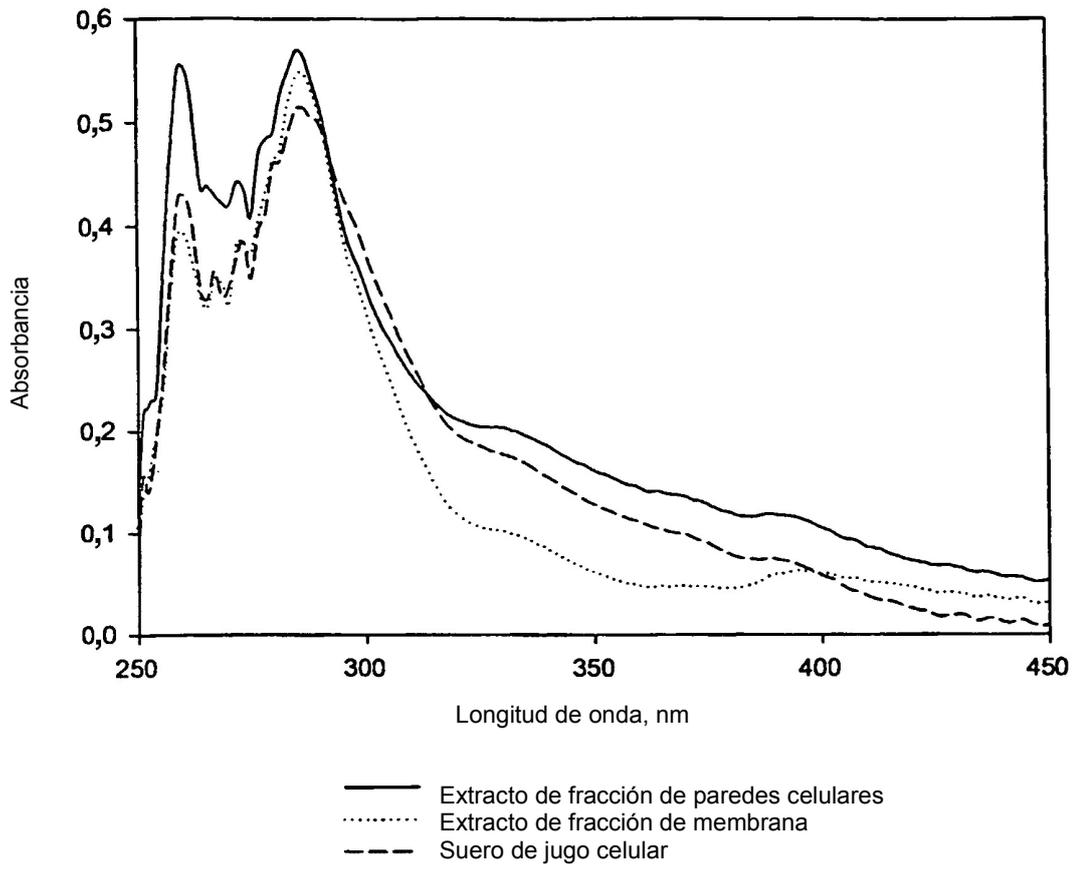


Figura 5

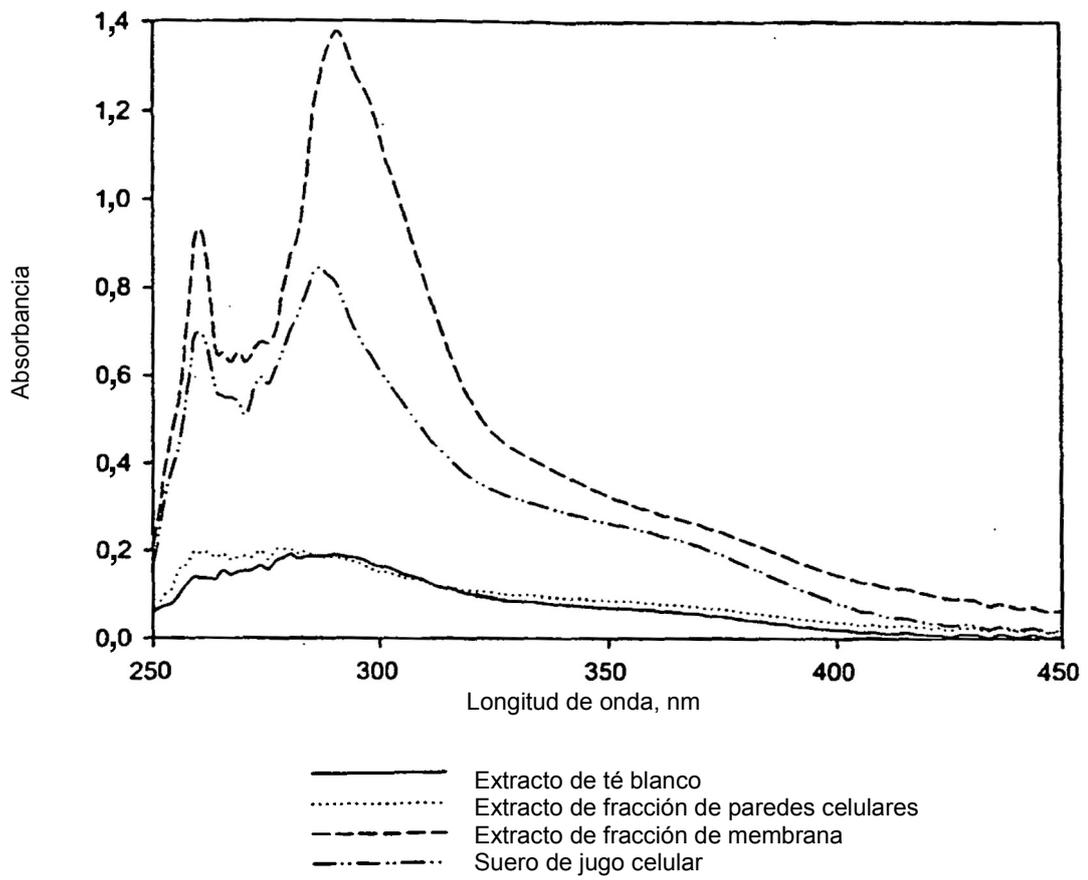


Figura 6

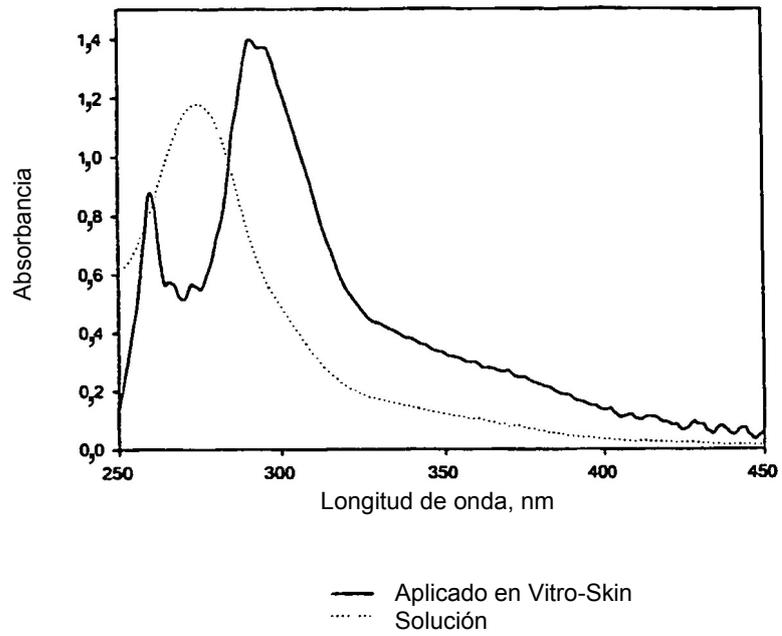


Figura 7A

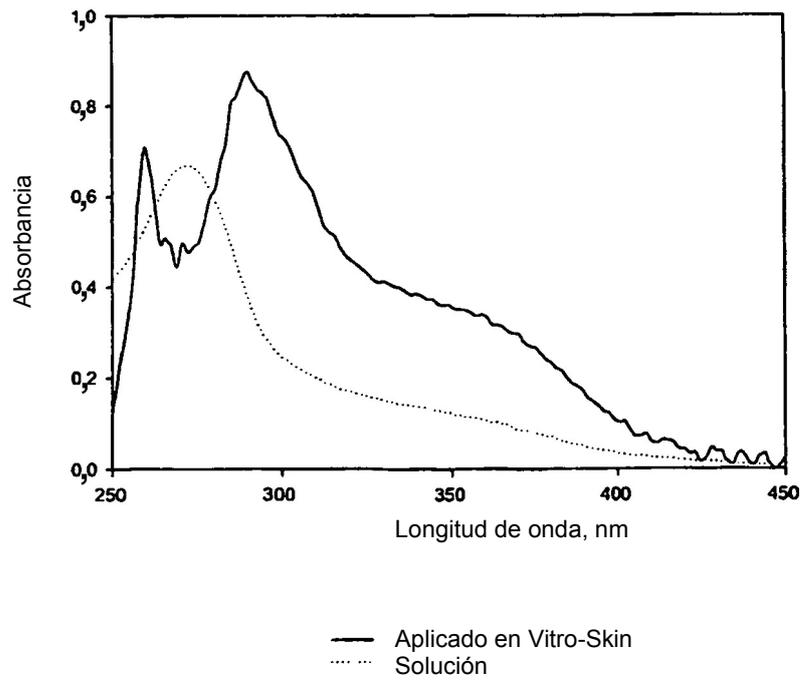


Figura 7B

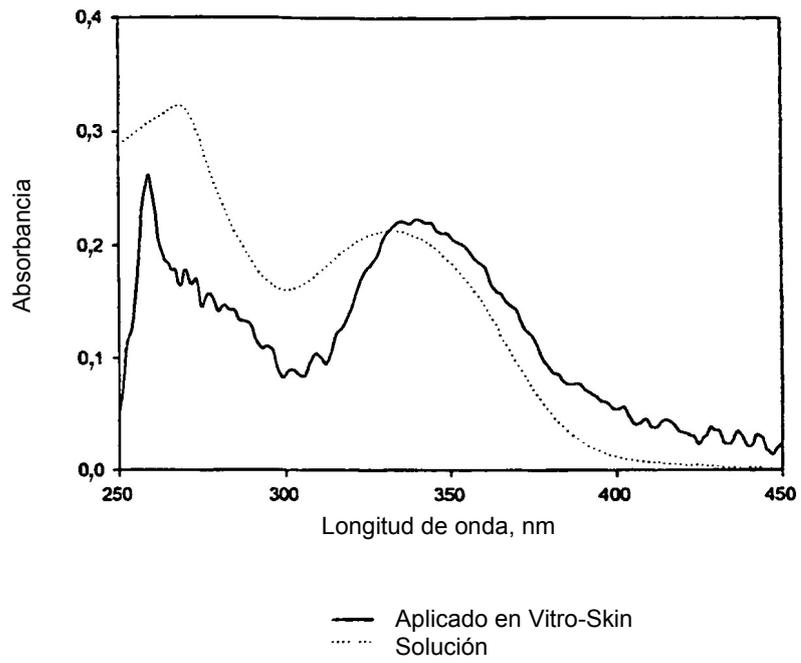


Figura 8A

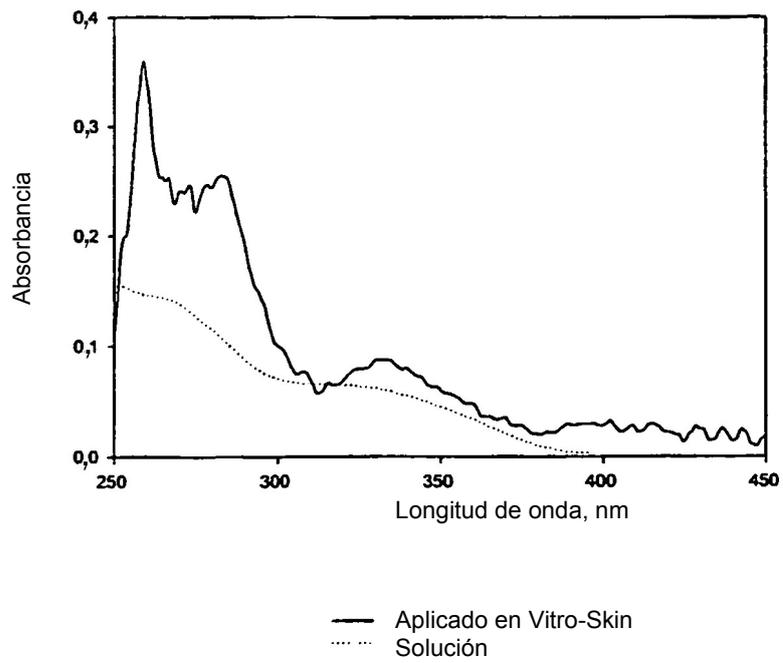


Figura 8B

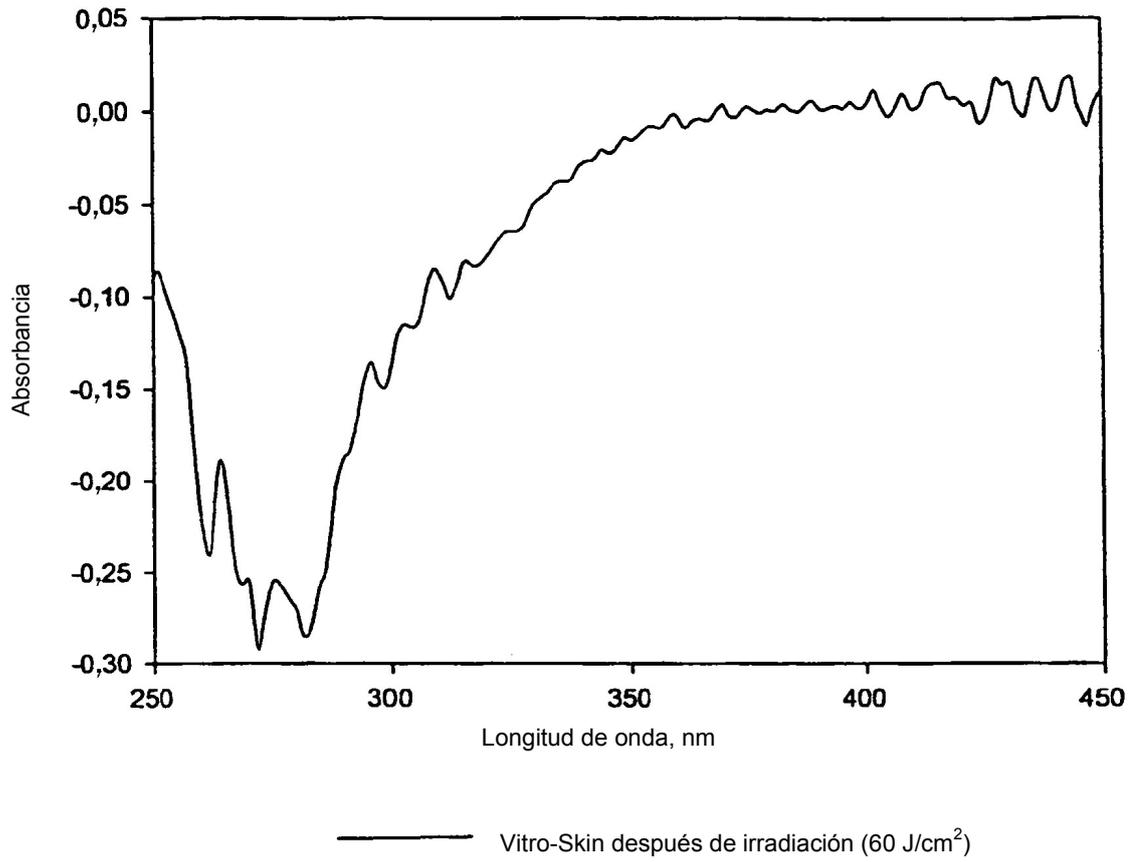


Figura 9

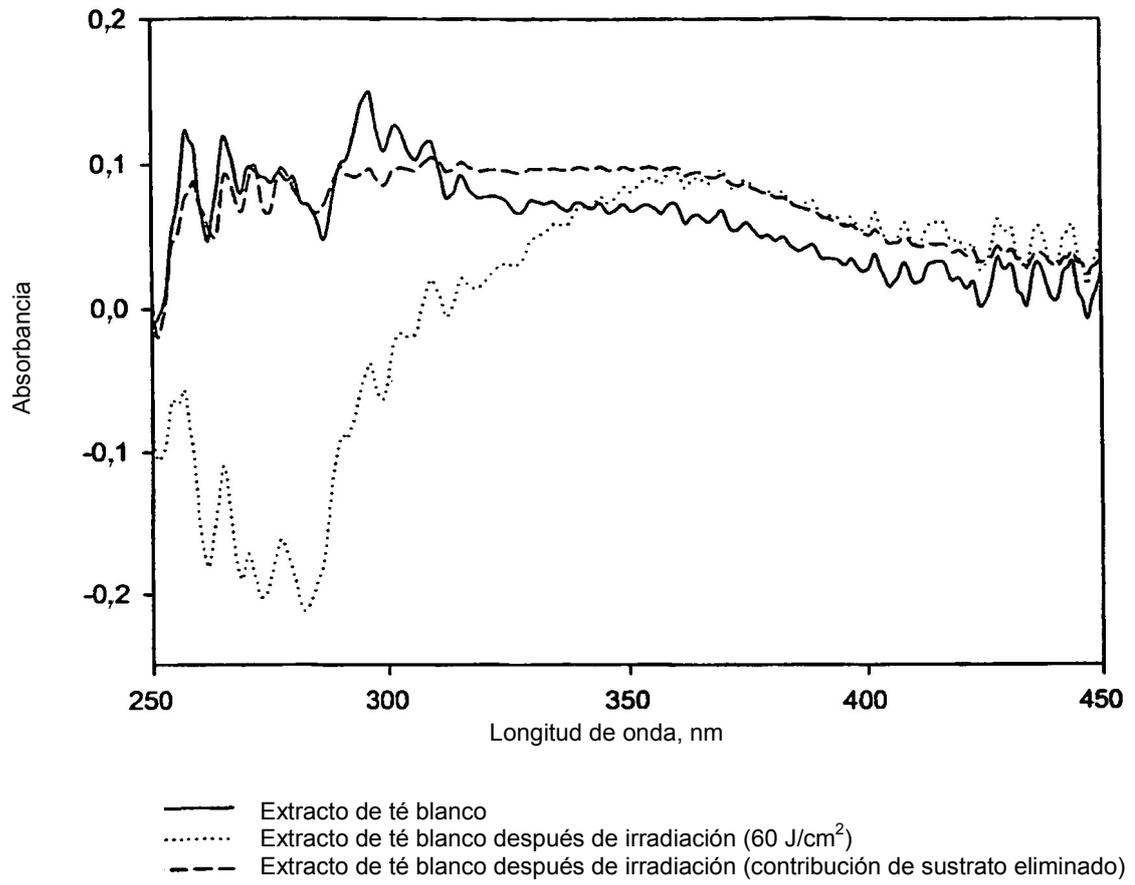


Figura 10

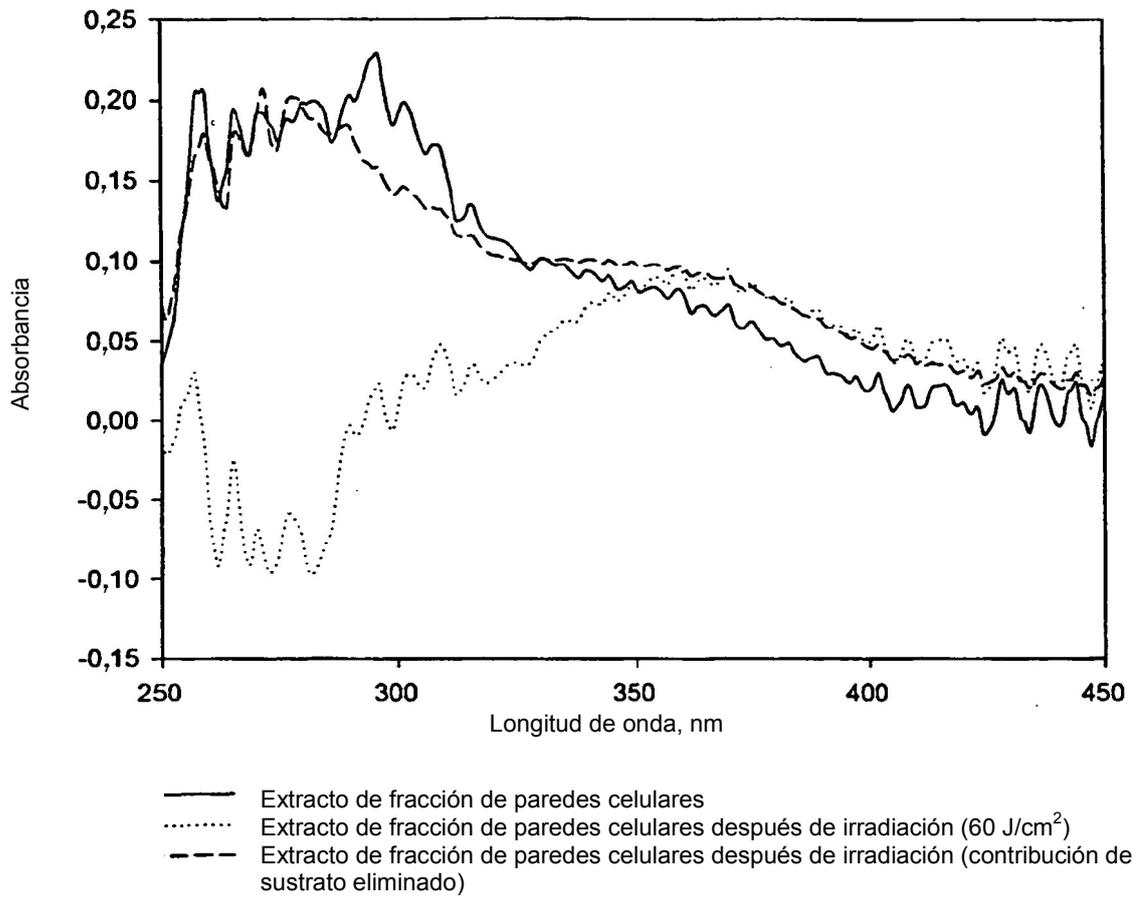


Figura 11

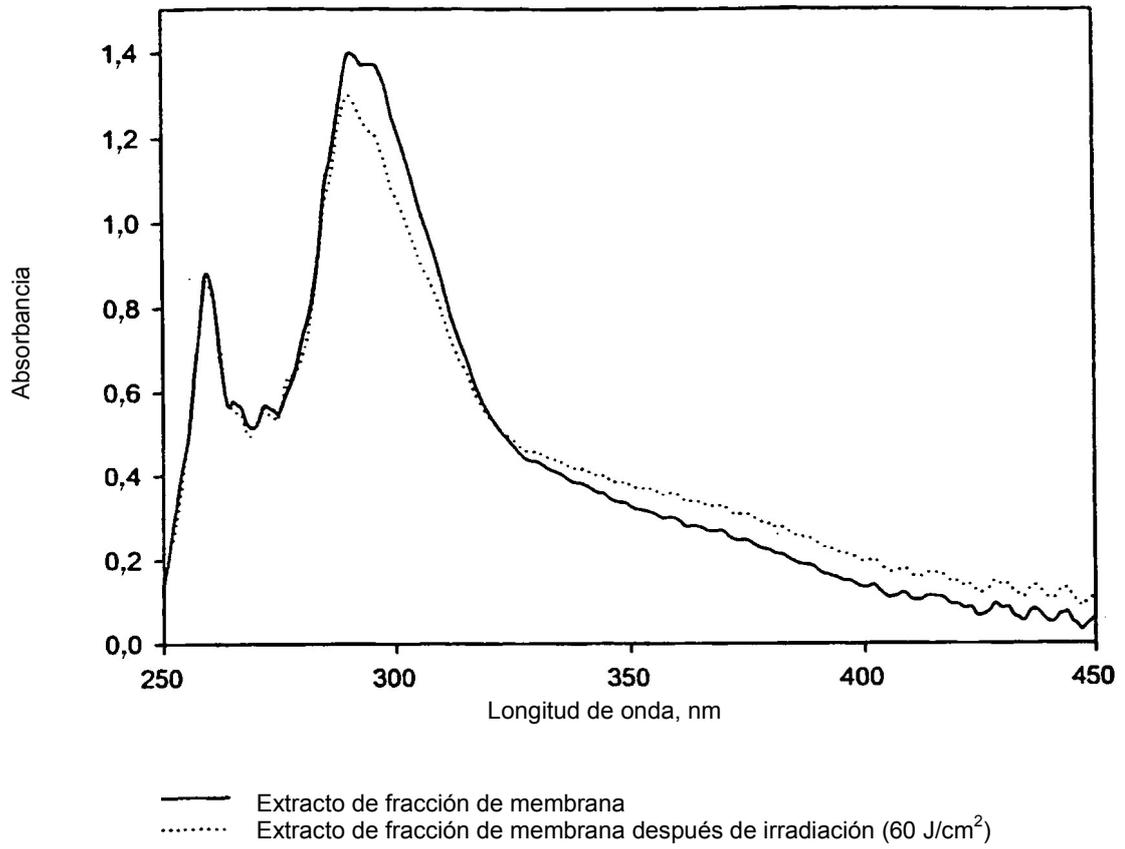


Figura 12

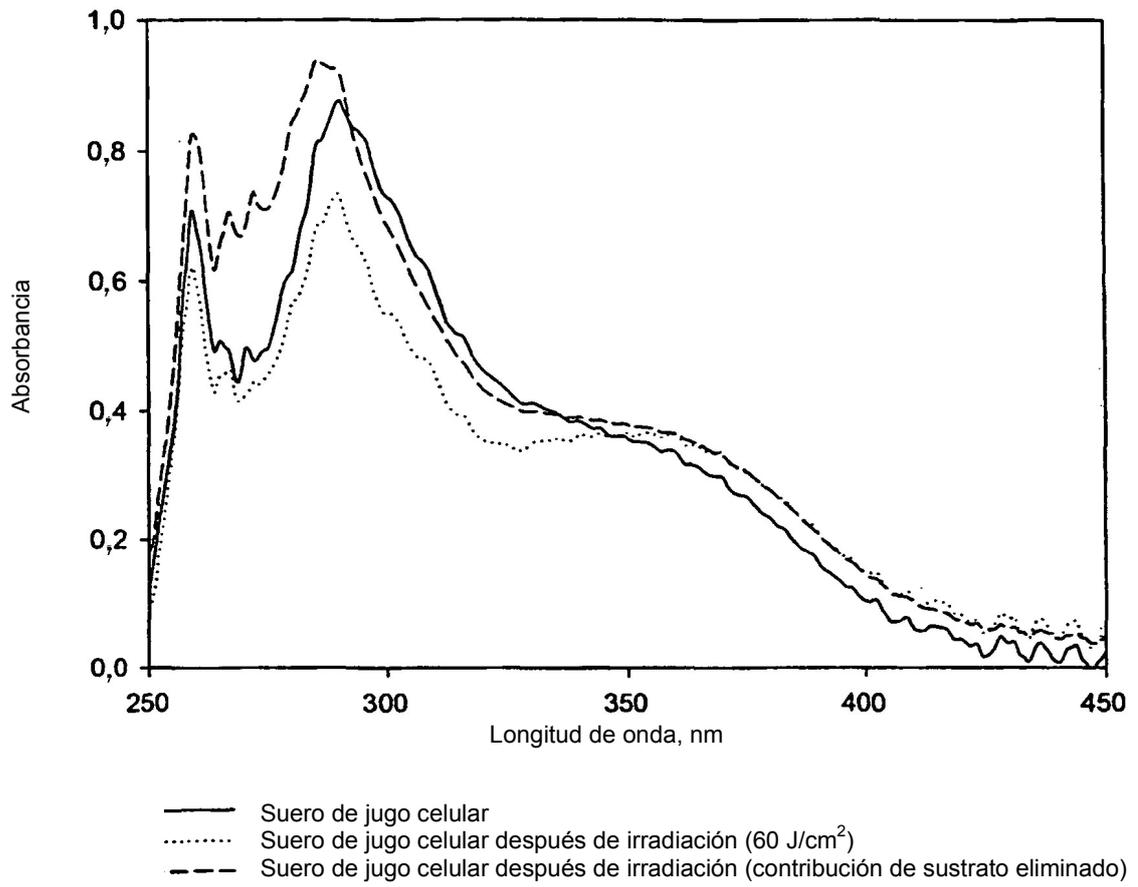


Figura 13

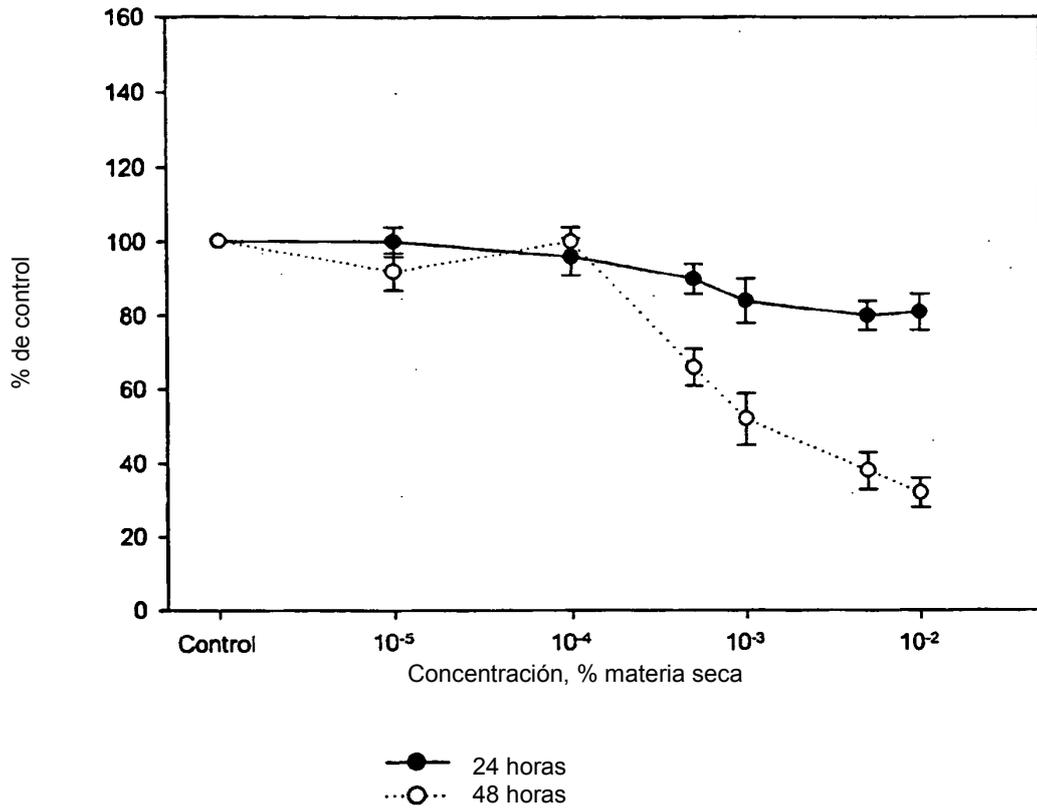


Figura 14

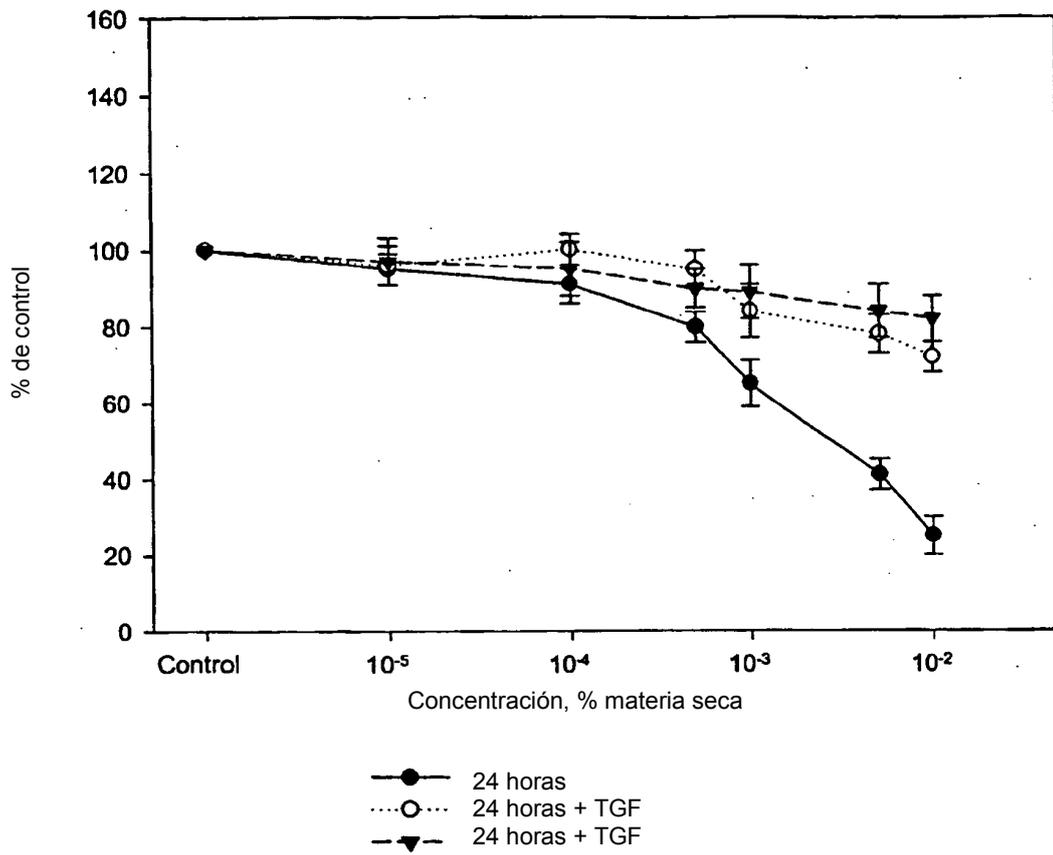


Figura 15

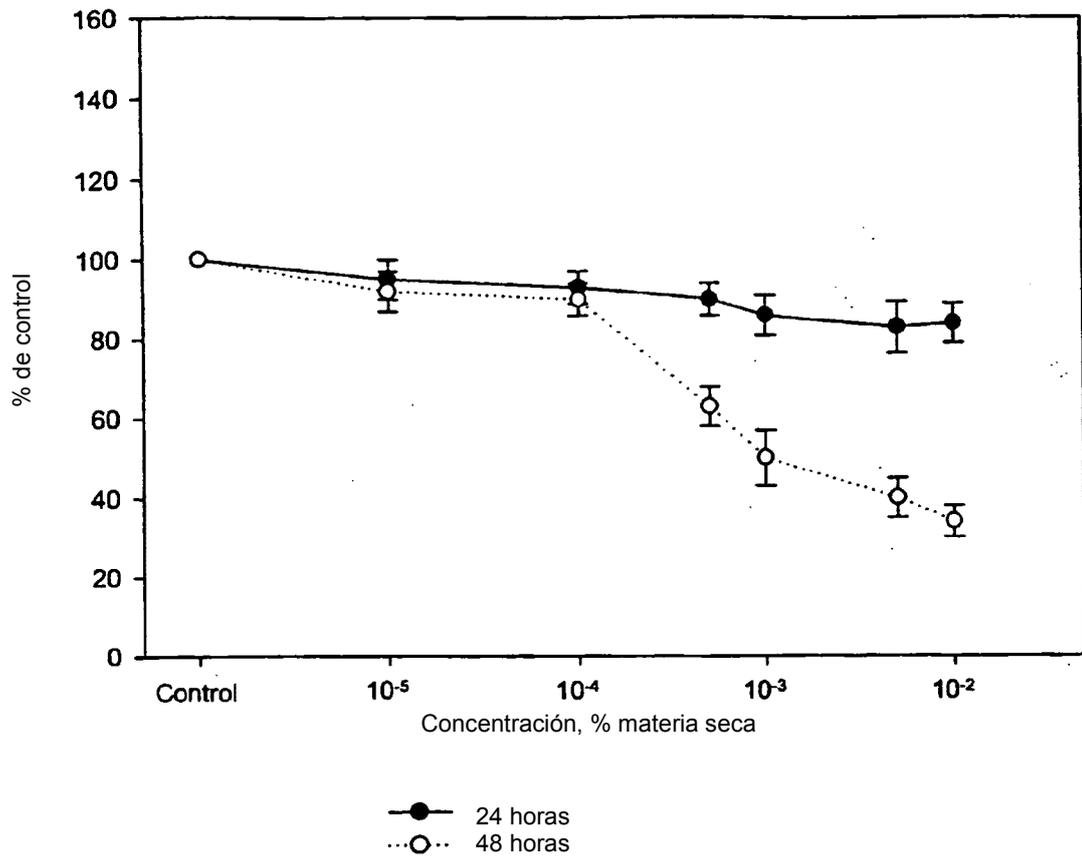


Figura 16

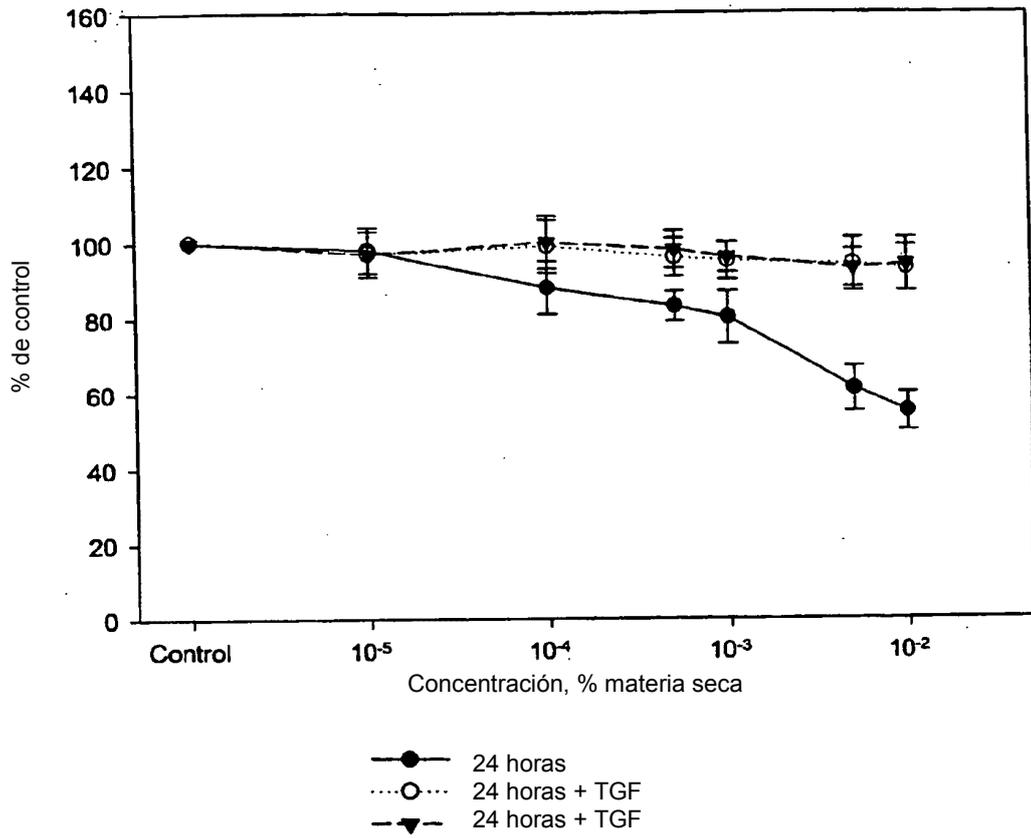


Figura 17

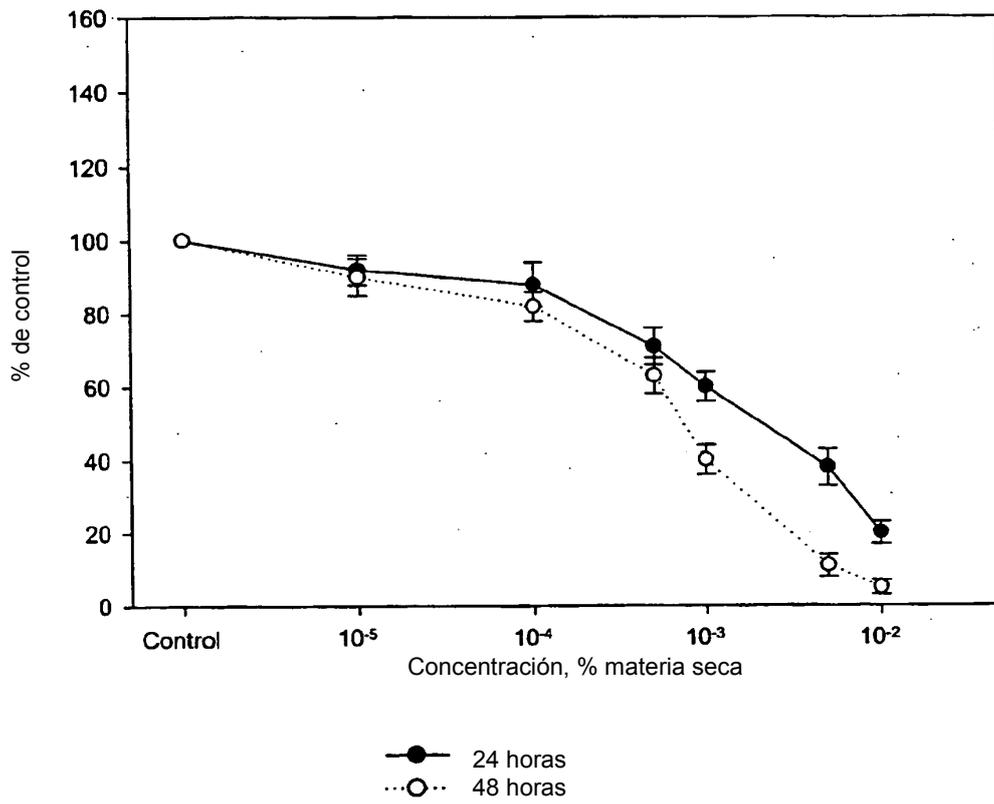


Figura 18

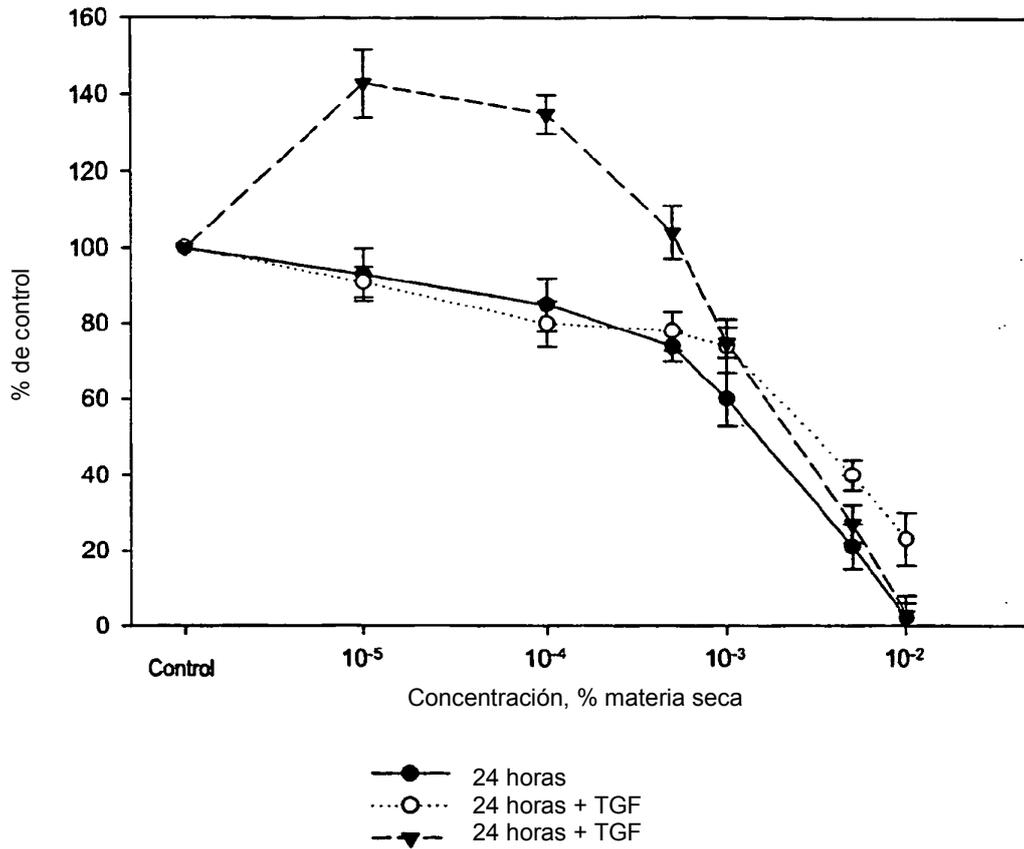


Figura 19

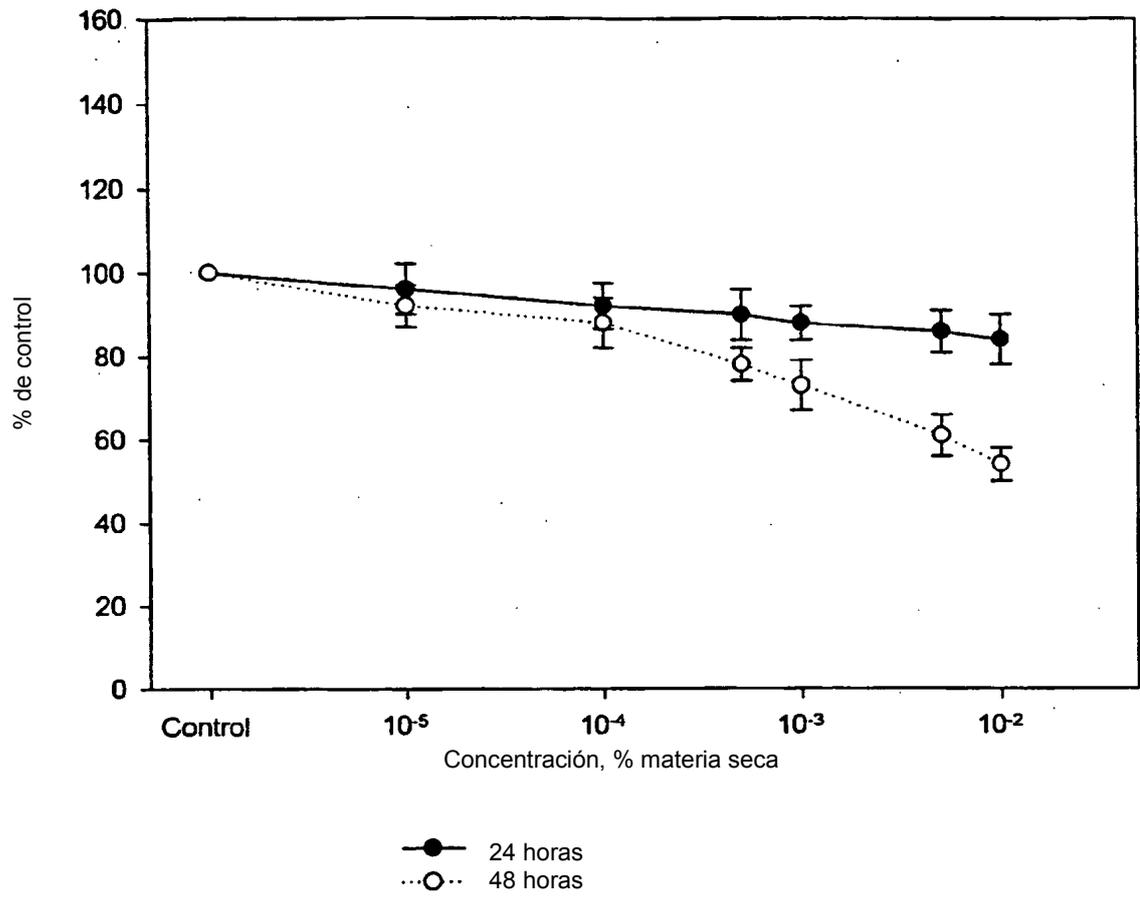


Figura 20

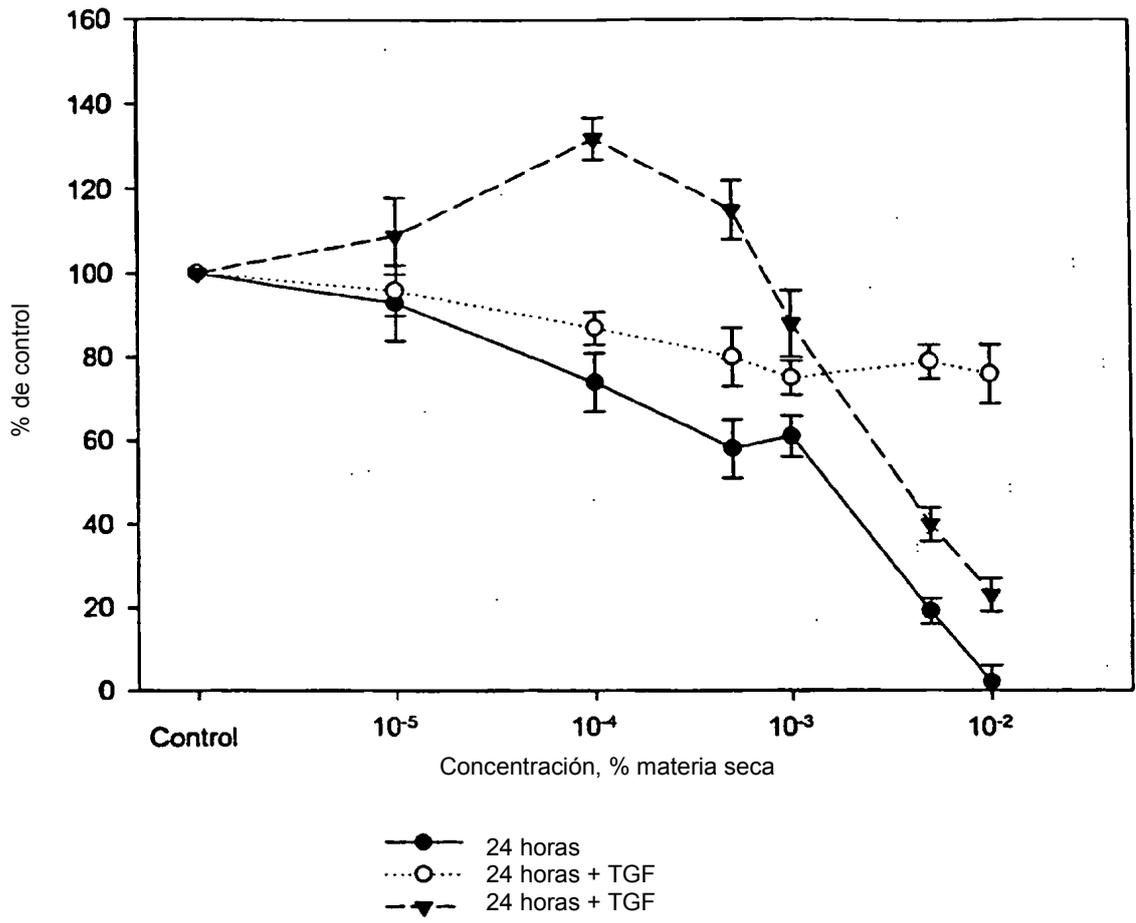


Figura 21

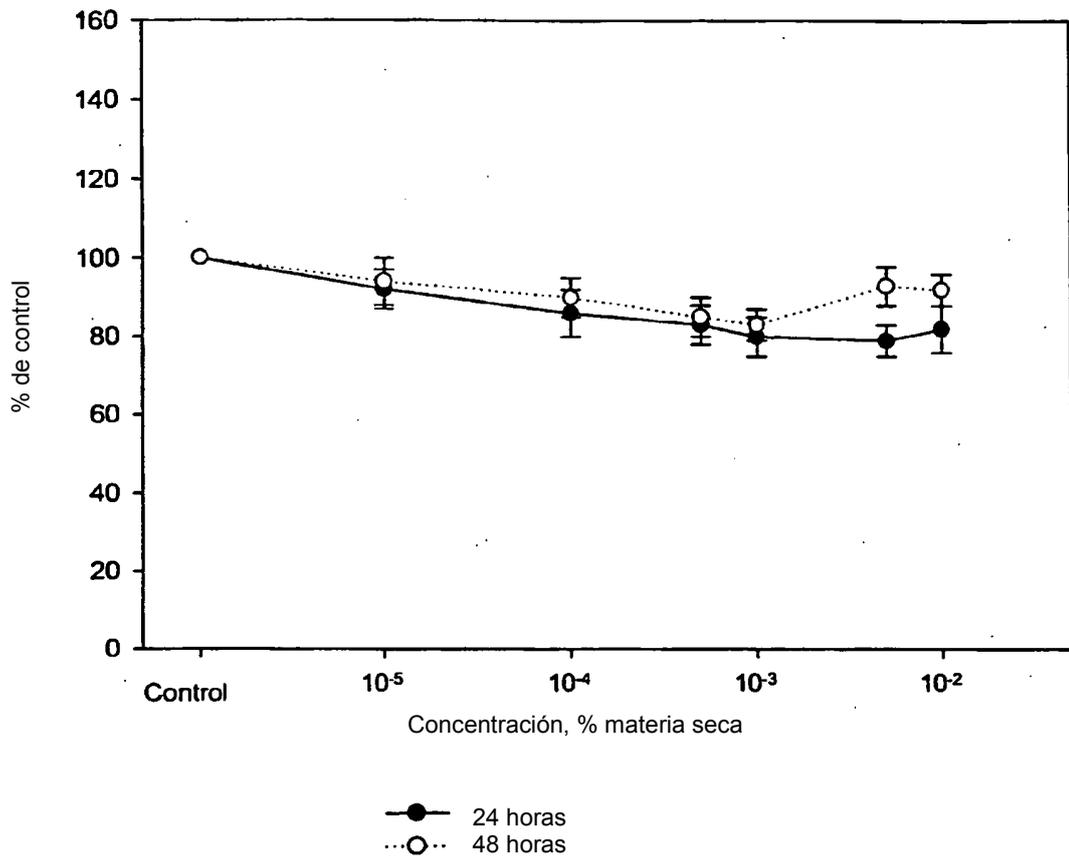


Figura 22

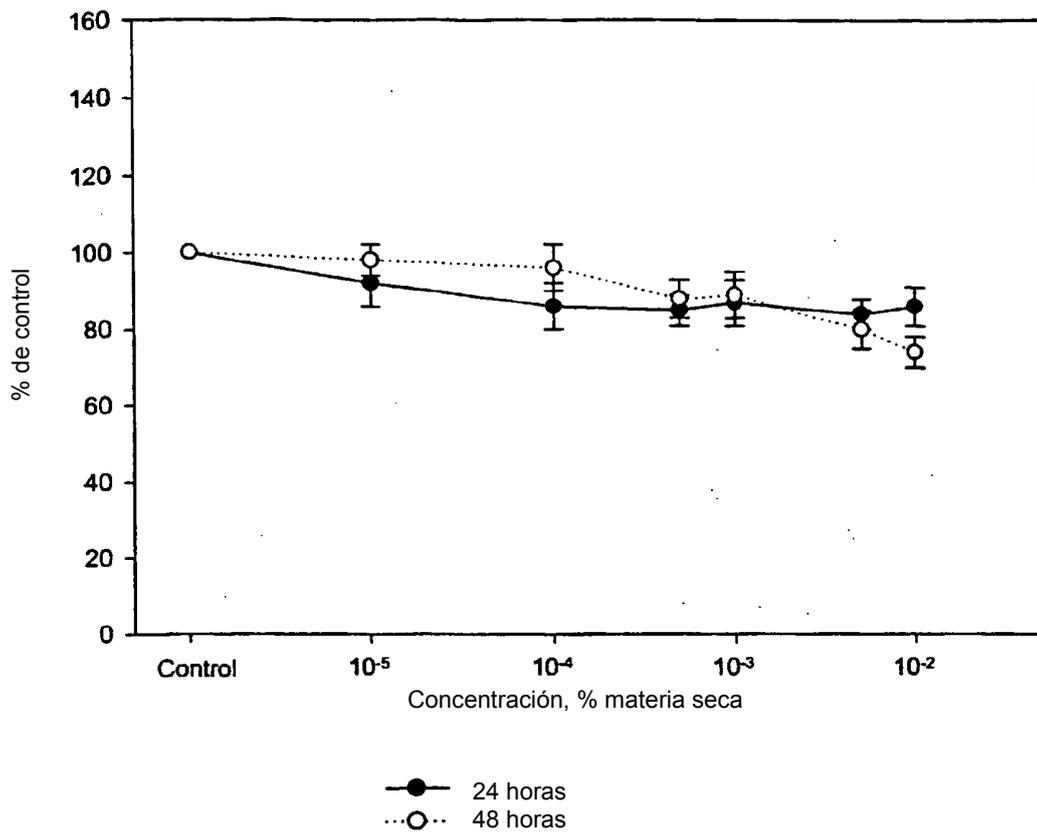


Figura 23

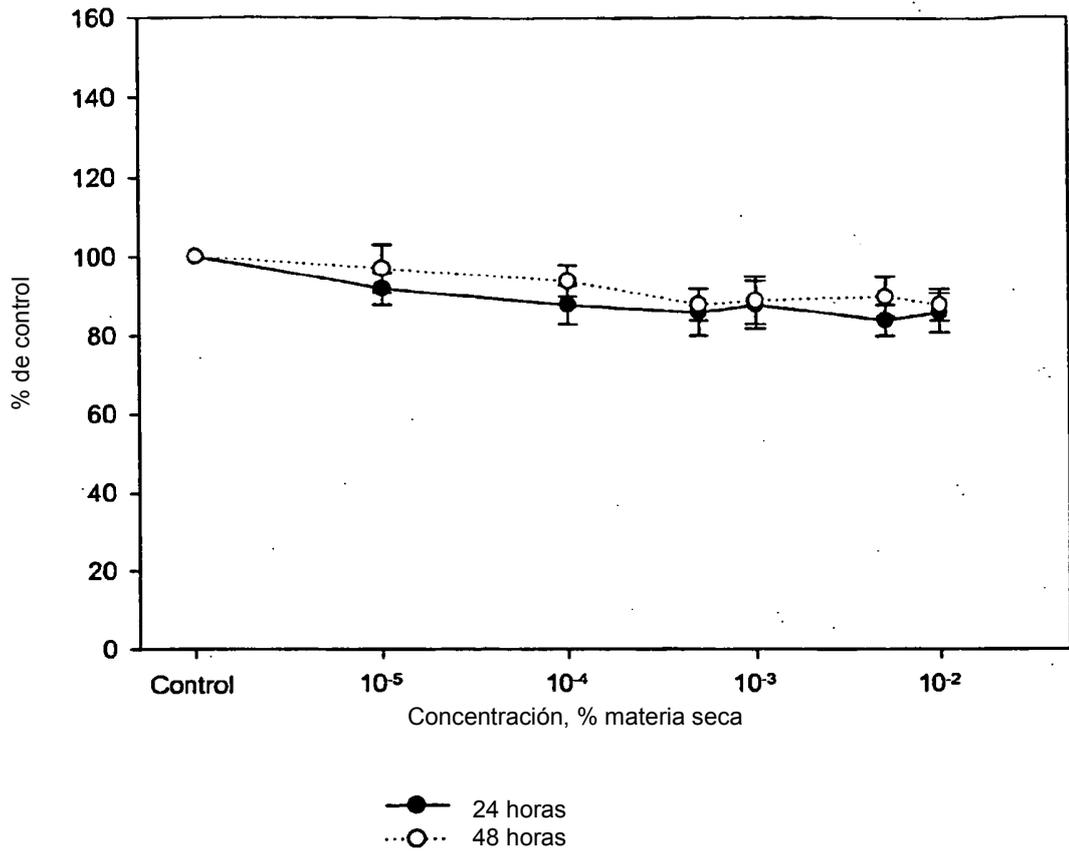


Figura 24

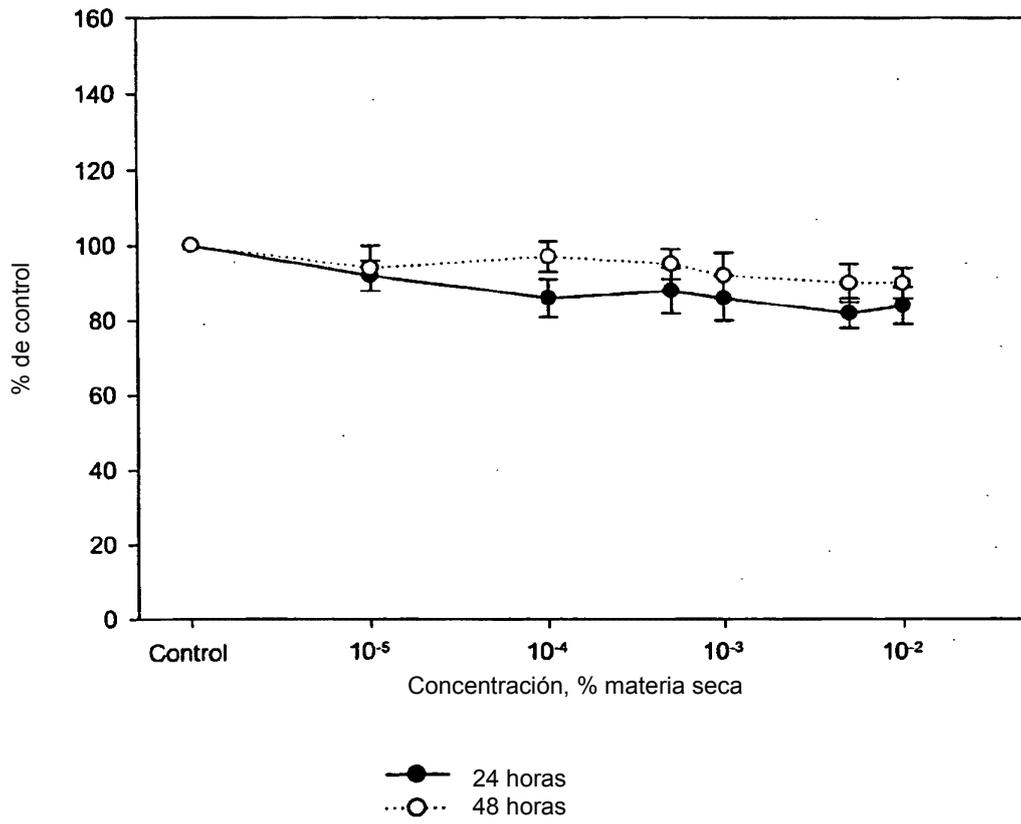


Figura 25

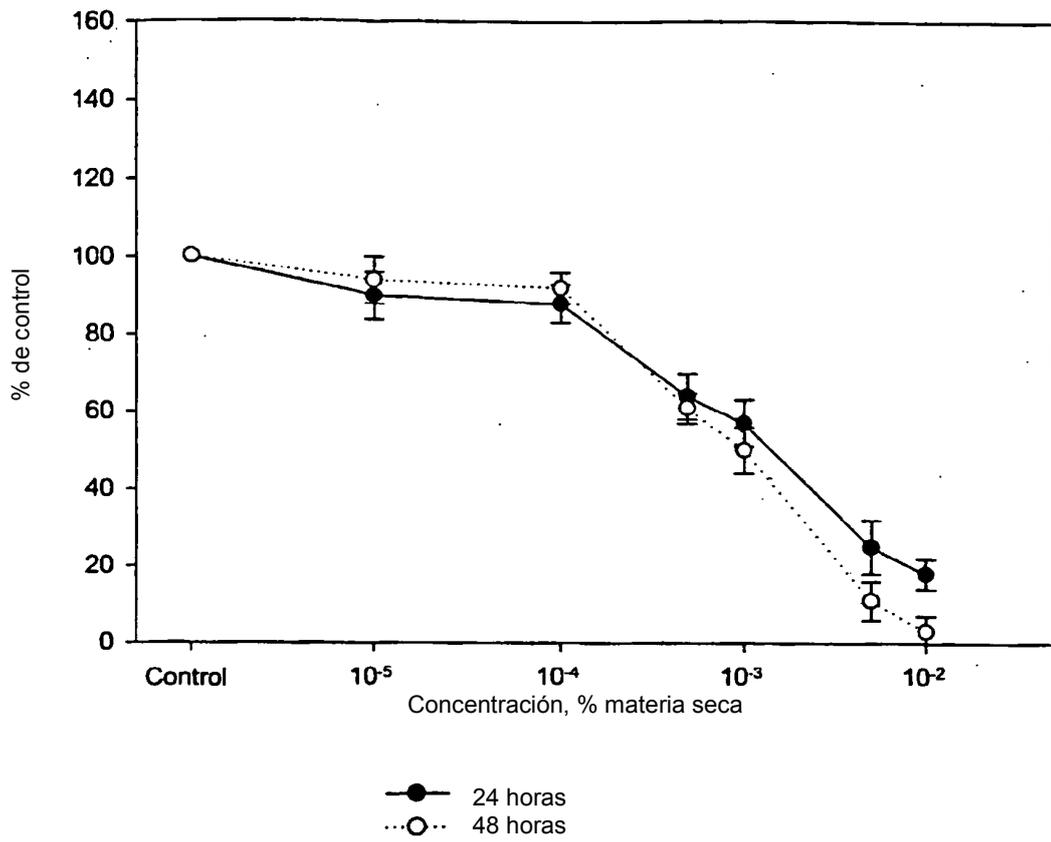


Figura 26

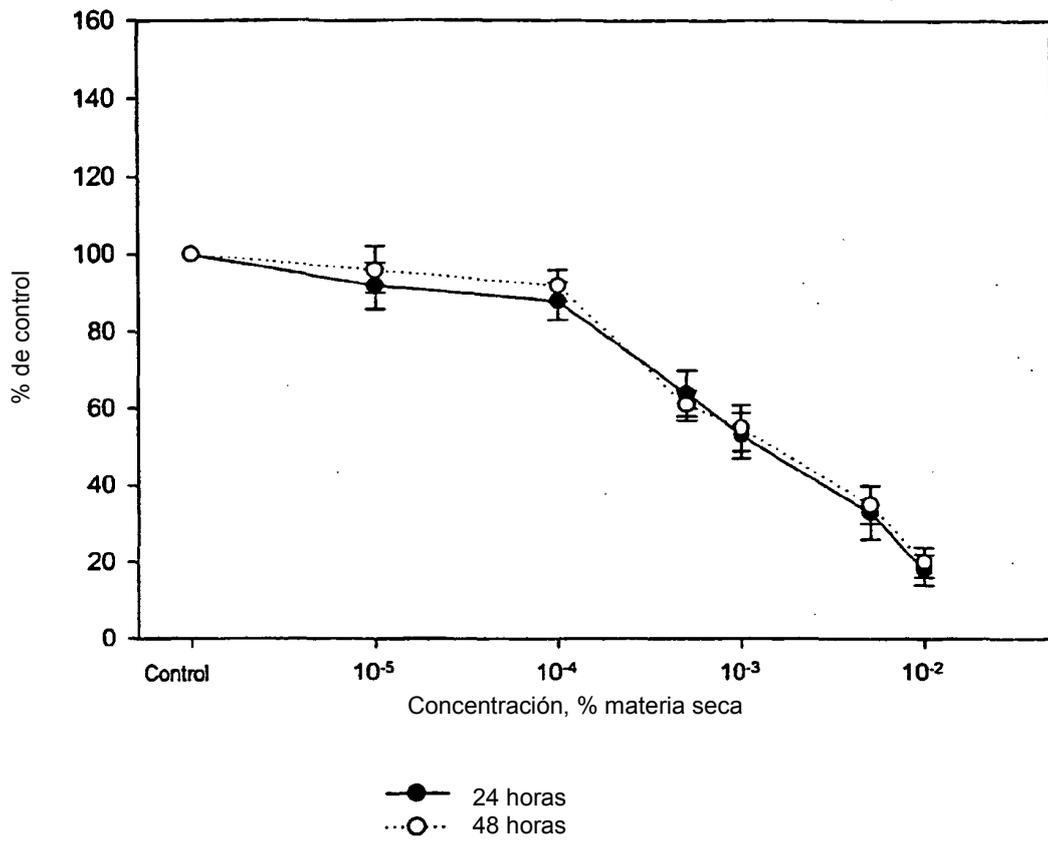


Figura 27

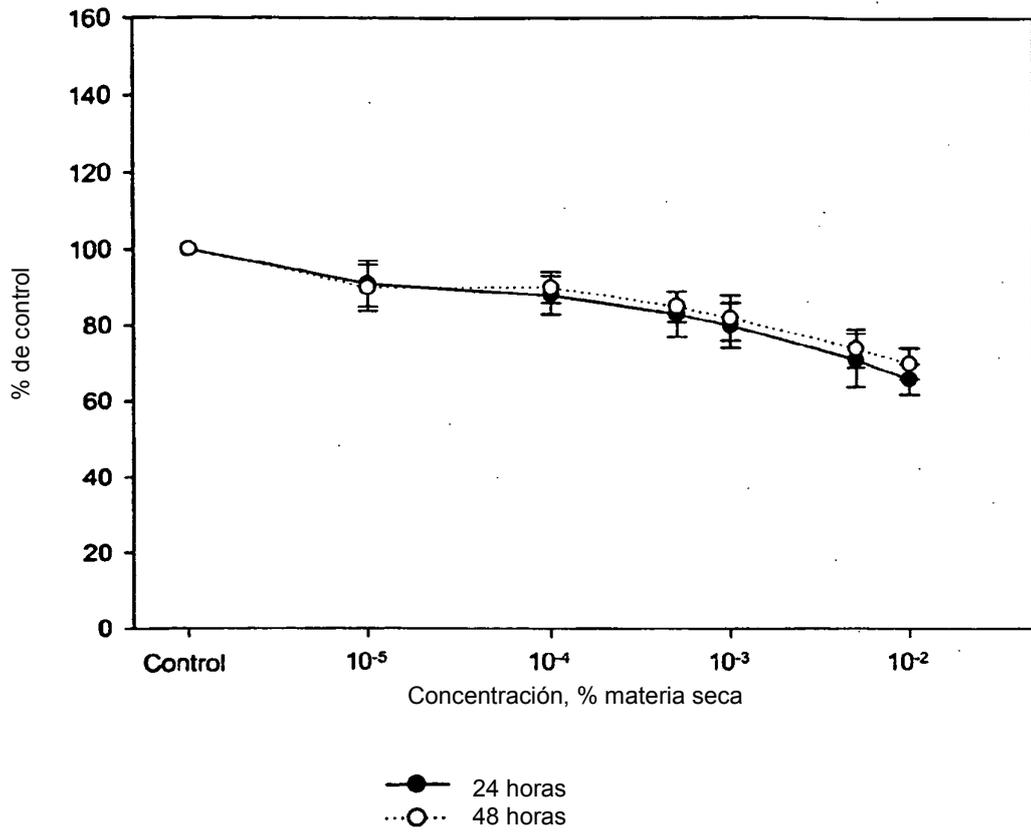


Figura 28

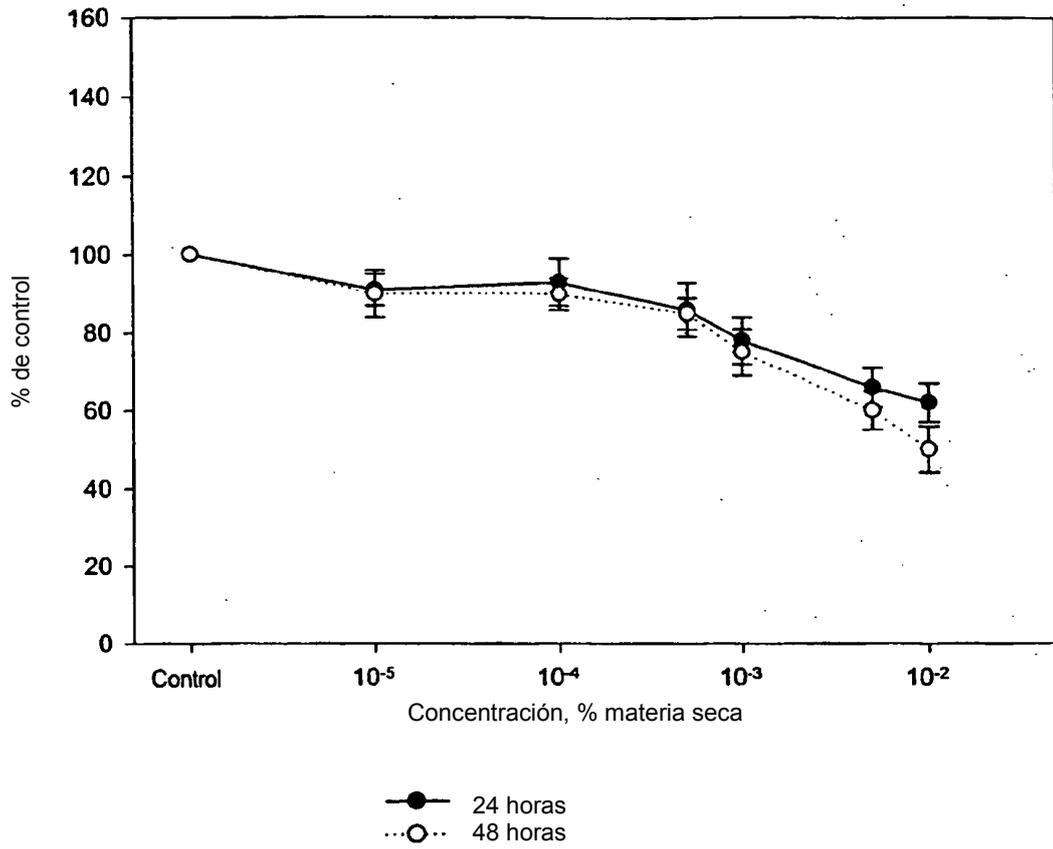


Figura 29

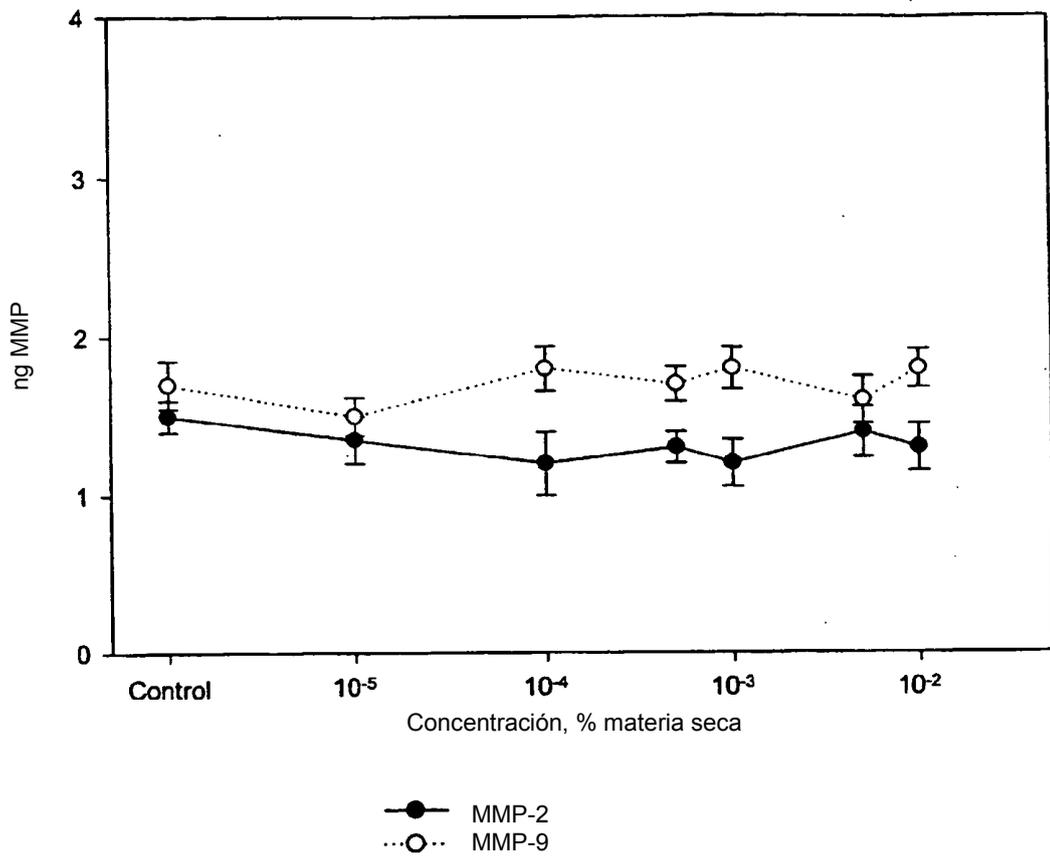


Figura 30

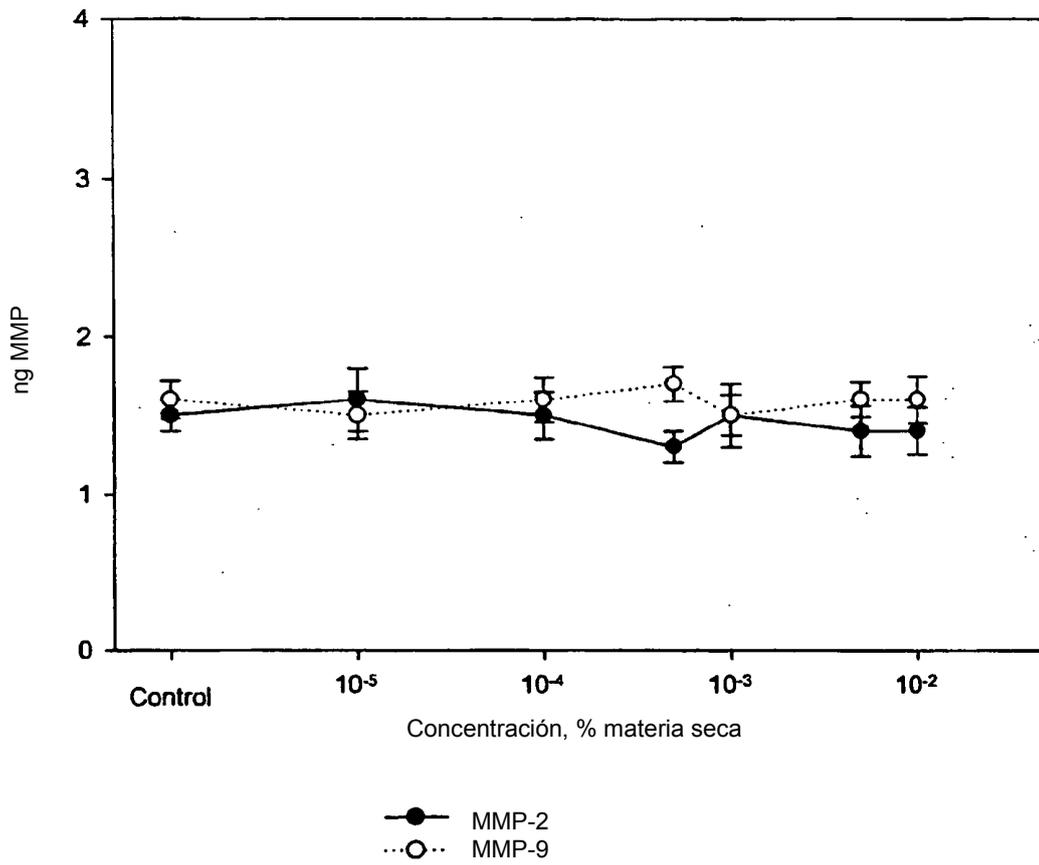


Figura 31

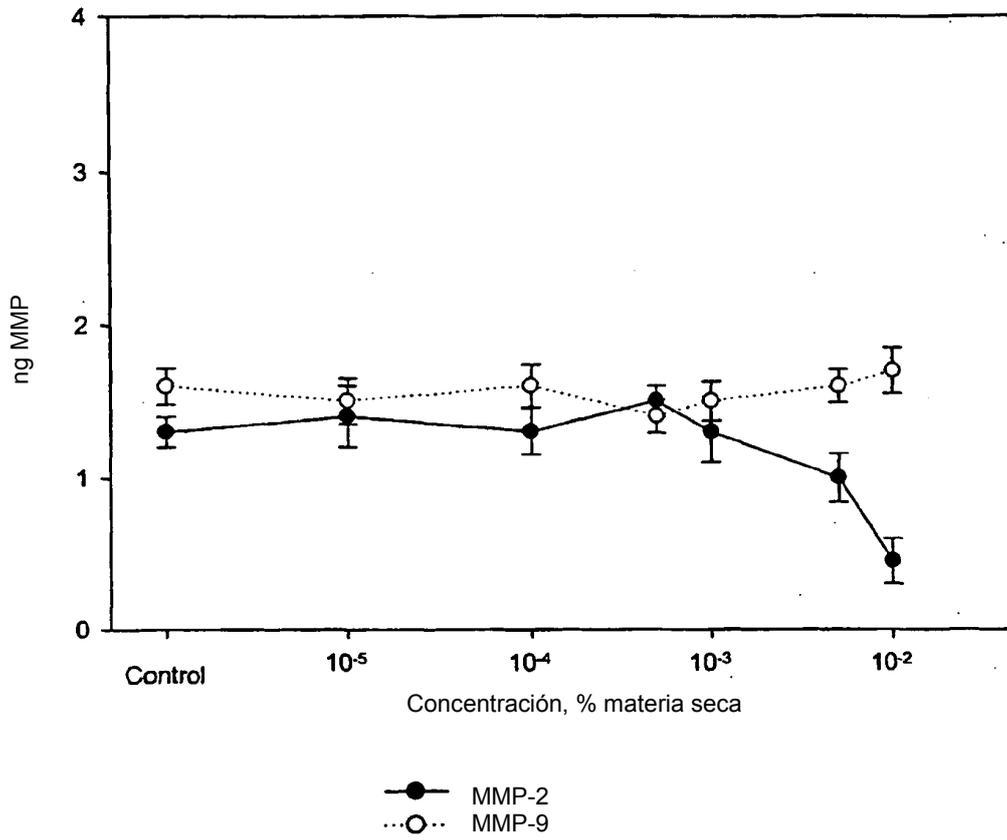


Figura 32

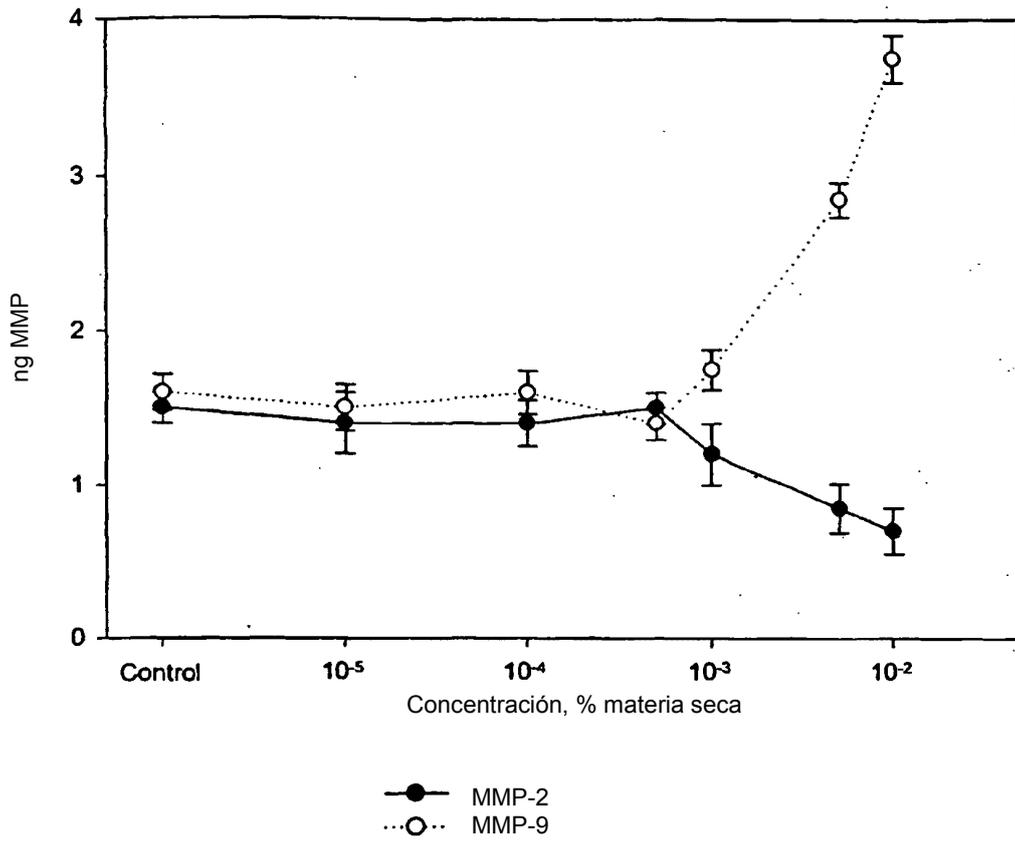


Figura 33

U **S** **1 bajo** **1 alto**



Figura 34

U **S** **2 bajo** **2 alto**

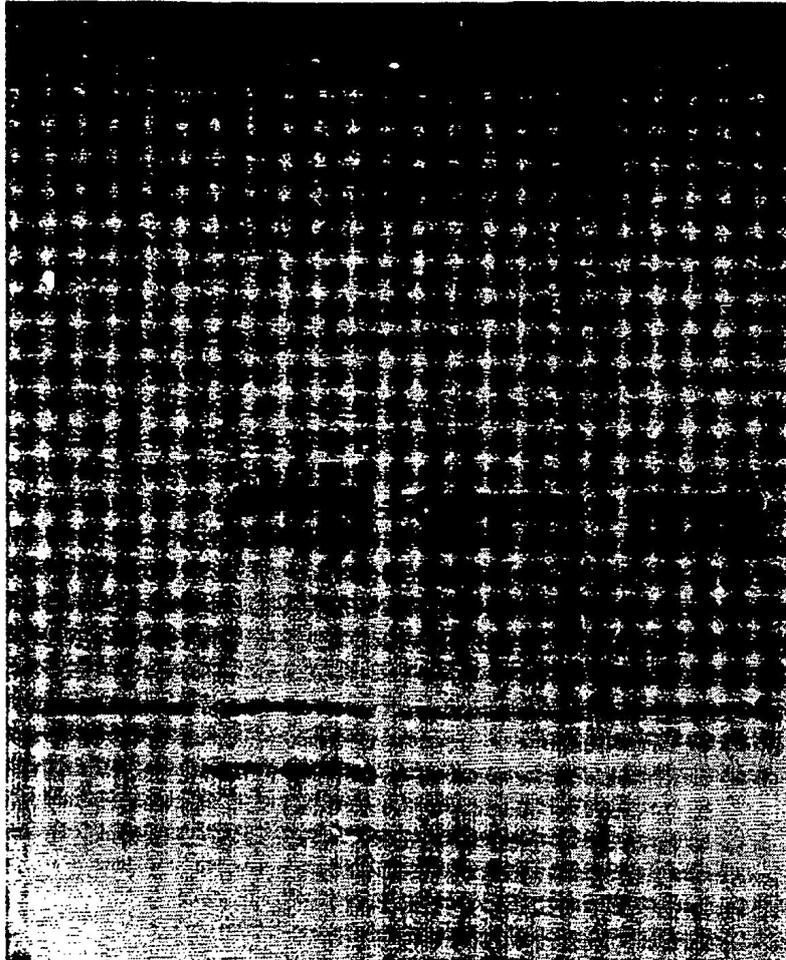


Figura 35

U S 4 bajo est 4 med 4 alto

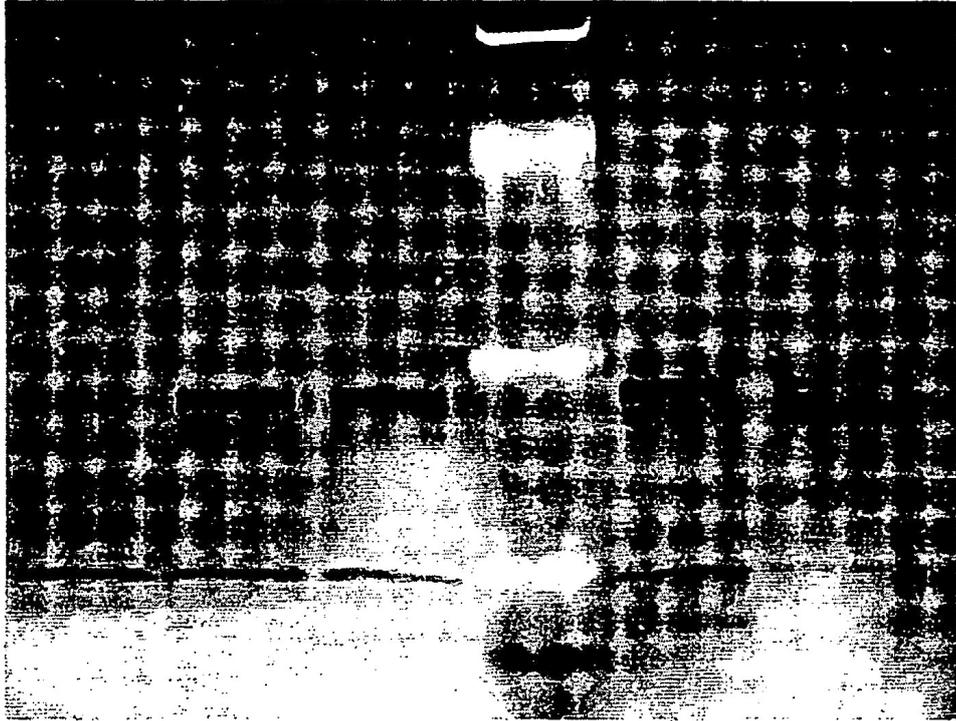


Figura 36

U **S** **3 bajo** **3 med** **3 alto**

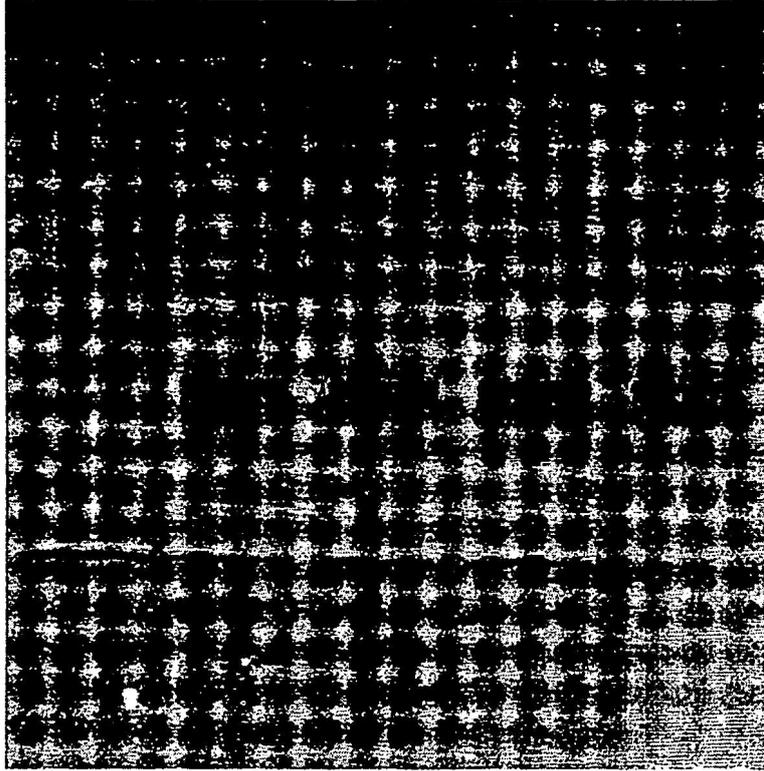


Figura 37

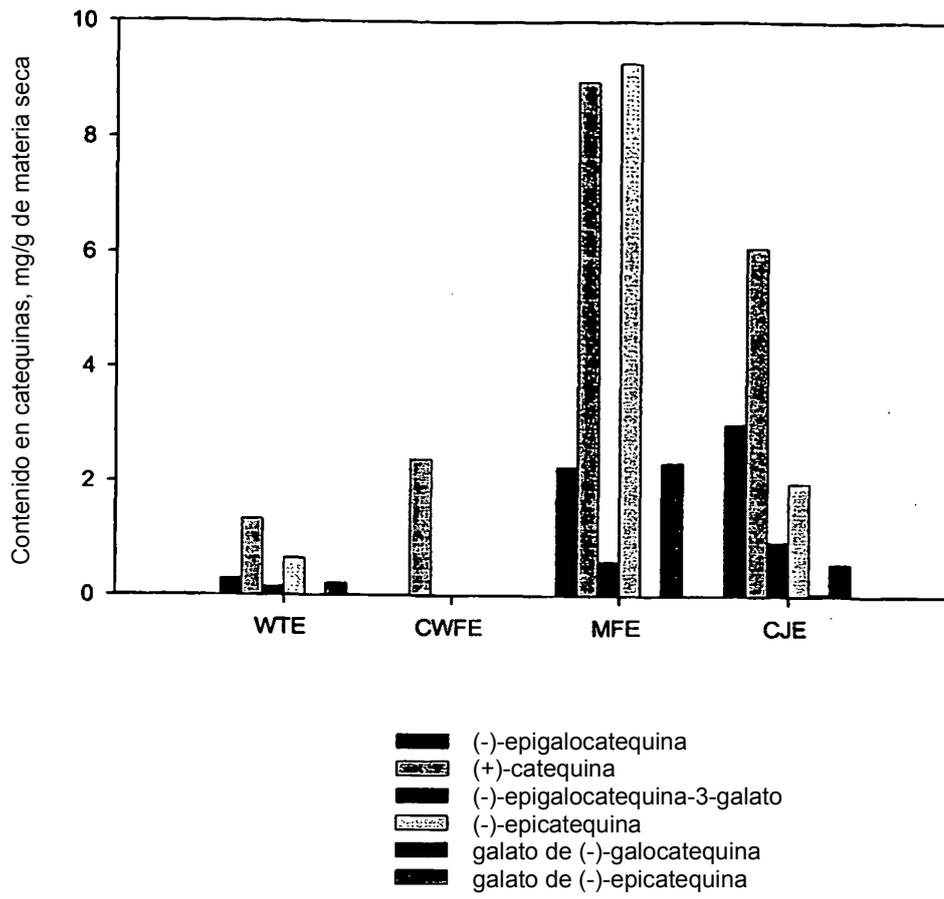


Figura 38